

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD LYON I

U. E. R. MÉDECINE GRANGE-BLANCHE

Année 1976 — N° 537

DIAGNOSTIC DE LA RUBÉOLE PAR INHIBITION DE
L'HÉMAGGLUTINATION

UTILISATION D'HÉMATIES HUMAINES O TRYPSINÉES

T H E S E

présentée

à l'Université Claude-Bernard — LYON I

et soutenue publiquement le 10 décembre 1976

pour obtenir le grade de DOCTEUR EN MÉDECINE

par

Jacques MORAND

né le 22 mars 1949

à SALLANCHES (Haute-Savoie)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD LYON I

U. E. R. MÉDECINE GRANGE-BLANCHE

Année 1976 — N° 537

**DIAGNOSTIC DE LA RUBÉOLE PAR INHIBITION DE
L'HÉMAGGLUTINATION**

UTILISATION D'HÉMATIES HUMAINES O TRYPSINÉES

T H E S E

présentée

à l'Université Claude-Bernard — LYON I

et soutenue publiquement le 10 décembre 1976

pour obtenir le grade de DOCTEUR EN MÉDECINE

par

Jacques MORAND

né le 22 mars 1949

à SALLANCHES (Haute-Savoie)



Président de l'Université : Professeur D. GERMAIN

Premier Vice-Président : Professeur E. ELBAZ

Deuxième Vice-Président : M. PONCET

Troisième Vice-Président : M. BONNET

Secrétaire Général : M. RAMBAUD

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE L'UNIVERSITE :

MEDECINE : GRANGE-BLANCHE : Directeur : M. Le Docteur B. SALLE (M.C.A.)
ALEXIS-CARREL : Directeur : M. Le Professeur C. GIROD
SUD-OUEST : Directeur : M. Le Professeur J. ROBERT
LYON-NORD : Directeur : M. Le Professeur J.P. GARIN
Directeur Honoraire : Professeur A. BERTOYE

BIOLOGIE HUMAINE : Directeur : M. Le Professeur J.C. CZYBA

TECHNIQUES DE READAPTATION : Directeur : M. Le Docteur A. MORGON (M.C.A)

SCIENCES PHARMACEUTIQUES : Directeur : M. Le Professeur L. ODDOUX

SCIENCES ODONTOLOGIQUES : Directeur : M. Le Docteur R. VINCENT

INSTITUT REGIONAL D'EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE : Président du Conseil
d'U.E.R. : M. Le Professeur R. GUILLET
Directeur : M.A. MILLON

MATHEMATIQUES : Directeur : M. Le Professeur H. BUCHWALTER

PHYSIQUE : Directeur : M. Le Professeur R. UZAN

CHIMIE ET BIOCHIMIE : Directeur : M. Le Professeur J. HUET

SCIENCES DE LA NATURE : Directeur : M. Le Professeur BRUN J.

SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Directeur : M. R. FONTANGES (M.C.A.)

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N°1 : Directeur M. Le Professeur POUYET

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N°2 : Directeur : M.J. GALLET
(Directeur ENSAM)

OBSERVATOIRE : Directeur : M. MONNET (Astronome Adjoint)

PHYSIQUE NUCLEAIRE : Directeur : M. Le Professeur GUSAKOW

MECANIQUE : Directeur : M. Le Professeur J. MATHIEU

EXAMINATEURS DE LA THESE

PRESIDENT : Monsieur le Professeur M. DUMONT

ASSESSEURS : Monsieur le Professeur J. P. GARIN
Monsieur le Professeur Agrégé P. VINCENT
Madame le Professeur Agrégé M. AYMARD

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

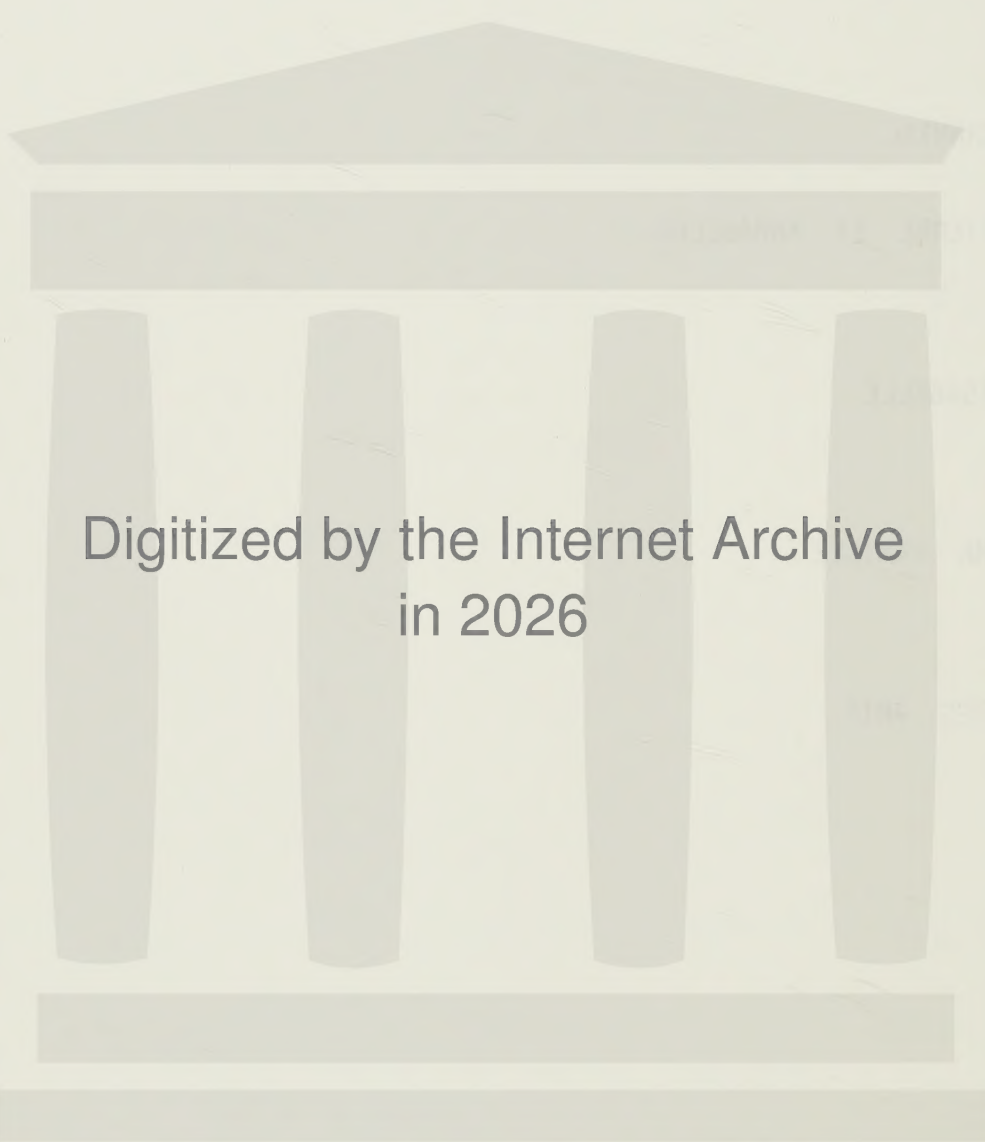
A CHANTAL

A PIERRE ET ANNABELLE

A ISABELLE

A MA FAMILLE

A MES AMIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553602_0001

A Monsieur DENOYEL

Chef de Service du Laboratoire de Virologie
de l'Institut Pasteur de LYON

Il nous a inspiré le sujet de notre thèse

Nous avons apprécié la bienveillance et la
simplicité avec lesquelles il nous a reçu
dans son laboratoire.

Le parfait fonctionnement de son service et
l'aide qu'il nous a apportée par ses conseils
avisés, nous ont permis de mener à bien notre
travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de notre gratitude et de notre respect

A tout le personnel du service de Virologie de l'Institut Pasteur
de LYON.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur M. DUMONT

Au cours des six mois passés dans son service, au début de notre spécialité, nous avons pu mesurer l'étendue de ses connaissances et la qualité de son sens clinique.

Nous avons pu apprécier l'extrême gentillesse dont il fait preuve à l'égard de tous.

Il nous a fait le grand honneur de présider cette thèse.

Qu'il soit assuré de notre gratitude et de notre profond respect.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur J. P. GARIN

Nous sommes très honoré de sa présence.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre reconnaissance et notre respect.

Monsieur le Professeur Agrégé P. VINCENT

Nous avons été touché par l'extrême gentillesse avec laquelle il nous a accueilli.

Nous le remercions de siéger parmi nos juges.

Madame le Professeur Agrégé M. AYMARD

Nous sommes heureux de sa présence dans notre jury.

Nous la remercions et l'assurons de notre respectueuse gratitude.

A TOUS LES MEDECINS DU CENTRE HOSPITALIER DE ROANNE

en particulier,

A Monsieur le Docteur MARGOTTON

A Monsieur le Docteur DEPIERRE

A Monsieur le Docteur FUMOUX

A Monsieur le Docteur MALLURET

A Monsieur le Docteur GAJA

A TOUS MES CAMARADES INTERNES DU CENTRE HOSPITALIER DE ROANNE

P L A N

INTRODUCTION

CHAPITRE I : Rappels sur la Rubéole

. HISTORIQUE

. LE VIRUS DE LA RUBEOLE

I - Classification

II - Structure et propriétés physico-chimiques

III - Caractères antigéniques

IV - Propriétés cytopathogènes du virus

. EPIDEMIOLOGIE

. CLINIQUE

I - Rubéole acquise

A) La forme typique

B) Les formes cliniques

1 - Les formes inapparentes

2 - Les formes frustes

3 - Les formes compliquées

II - Rubéole congénitale

A) Le syndrome de rubéole congénitale

1 - Avortement spontané

2 - Séquelles malformatives

3 - Manifestations néonatales

B) Etude statistique des malformations foetales et des manifestations néonatales.

• DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

I - Le diagnostic biologique

A) L'isolement du virus

1 - Le prélèvement

2 - Les techniques

a) la technique indirecte ou
d'interférence

b) la technique directe

B) Les techniques sérologiques

1 - La réaction de neutralisation

a) la méthode indirecte ou
d'interférence

b) la méthode directe

2 - Les autres méthodes

a) la réaction de fixation du complément

b) la réaction d'immunofluorescence

3 - La réaction d'inhibition de
l'hémagglutination

C) Les examens immunologiques

II - Quelques applications pratiques

A) Dans le cas de suspicion d'une rubéole
congénitale

B) Devant une maladie éruptive, le problème
des réinfections

C) Rubéole et grossesse

1 - Dans le cas d'une éruption

2 - Cas d'un simple contact

D) Le contrôle systématique de l'Immunité
Rubéolique

• PROPHYLAXIE

I - Prophylaxie par la vaccination

A) Les vaccins

B) La vaccination

1 - Les deux politiques de vaccination de masse

2 - Le problème de la vaccination des femmes en âge d'avoir des enfants

II - Les autres moyens de prophylaxie

A) Les mesures générales avant tout contag

B) Les injections de gammaglobulines après le contag

C) L'avortement thérapeutique

CHAPITRE II : La réaction d'inhibition de l'hémagglutination

I - Principe de la réaction

II - La technique de la réaction

A) Les réactifs

1 - L'antigène

2 - Les tampons

a) Le D G V

b) Tampon alcalin pH 9 et tampon acide

c) Tampon H.S.A.G

3 - Les globules rouges

B) La préparation des sérums : l'adsorption

- 1 - Les agglutinines non spécifiques
- 2 - Les inhibiteurs non spécifiques
 - a) Technique utilisant le kaolin
 - b) Technique utilisant l'héparine et le $MnCl_2$
 - c) Technique utilisant le sulfate de Dextran et le $CaCl_2$

C) Description de la technique utilisée à l'Institut Pasteur de Lyon

- 1 - Le traitement des sérums : l'adsorption
- 2 - Le titrage de l'antigène
- 3 - La réaction d'inhibition de l'héماغglutination
 - a) La réaction elle-même
 - b) Les contrôles à effectuer
 - le témoin sérum
 - le contrôle de l'adsorption (témoin SINDBIS)
 - le sérum témoin positif et le sérum témoin négatif
 - le contrôle du titrage de l'antigène

III - Les Problèmes techniques de la réaction d'inhibition de l'héماغglutination

CHAPITRE III : Etude comparative de deux techniques utilisant des globules rouges humains O+ trypsinés avec une technique de référence utilisée à l'Institut Pasteur de LYON.

I - Présentation des techniques

A) La technique de référence

B) Technique n°1 utilisant des hématies humaines O+ trypsinées, héparine $MnCl_2$, HS AG

- 1 - Le tampon HS AG
- 2 - L'héparine
- 3 - $MnCl_2$

- 4 - Les globules rouges humains O+
- 5 - La trypsination des globules rouges
- 6 - La suspension de travail
- 7 - Le traitement des sérums
- 8 - Le titrage de l'antigène
- 9 - La réaction d'inhibition de l'hémagglutination

C) Technique n° 2 utilisant des hématies humaines O+ trypsinées, kaolin, tampon alcalin pH9 et tampon acide

D) Techniques utilisées pour rechercher les IgM spécifiques

- 1 - La technique de référence
- 2 - Application des techniques n° 1 et n° 2 à la recherche des IgM spécifiques

II - Résultats

A) Les titrages de l'antigène

B) La réaction d'inhibition de l'hémagglutination

1 - Comparaison des résultats obtenus par la technique n° 1 et de ceux obtenus par la technique de référence.

2 - Comparaison des résultats obtenus par la technique n° 2 et de ceux obtenus par la technique de référence.

C) Comparaison des techniques n° 1 et n° 2 appliquées à la recherche d'IgM spécifiques et de la technique de référence.

D) Un essai d'amélioration du temps de conservation des hématies O+ trypsinées par le formol.

III - Discussion

- A) A propos des résultats obtenus lors de la réaction d'I.H.A. par la technique n°1
- B) A propos des résultats obtenus lors de la réaction d'I.H.A. par la technique n°2
- C) A propos des résultats obtenus en utilisant les techniques n°1 et n°2 dans la recherche d'IgM spécifiques
- D) A propos de l'utilisation des globules rouges O+ trypsinés

CONCLUSION
=====

BIBLIOGRAPHIE
=====

TABLE DES MATIERES
=====

INTRODUCTION

Maladie infectieuse, virale, contagieuse, endémo-épidémique, la rubéole survient à tout âge, confère une immunité solide et durable n'empêchant pas les réinfections inapparentes. Son évolution est presque constamment bénigne, mais contractée par une femme enceinte non immune pendant les premiers mois de la grossesse, elle peut être cause chez l'enfant de malformations graves et de manifestations néonatales sévères.

C'est dire l'intérêt de son diagnostic qui repose essentiellement sur le sérodiagnostic par inhibition de l'héماغglutination. C'est un essai d'amélioration des techniques utilisées pour réaliser ce sérodiagnostic qui fait l'objet de ce travail.

CHAPITRE I

RAPPELS SUR LA RUBEOLE

HISTORIQUE

La rubéole est décrite pour la première fois par HOFFMAN en 1740 sous le nom de "German measles", rougeole allemande.

C'est au congrès international de Médecine de Londres en 1881 que la description clinique de la rubéole individualise définitivement celle-ci de la rougeole.

Pendant plus d'un demi-siècle, rares, sont les travaux suscités par cette maladie considérée comme bénigne. Nous signalons cependant ceux de HIRO et TASAKA (1938) qui démontrent l'origine virale de la rubéole.

C'est à la suite de l'épidémie australienne de 1941 que Sir Norman GREGG (122), ophtalmologiste, établit tout d'abord la relation de cause à effet entre les cataractes congénitales des nouveaux-nés et la rubéole présentée par les mères au cours du premier trimestre de la grossesse puis décrit les autres séquelles malformatives de la rubéole congénitale.

En 1962 deux équipes américaines travaillant séparément, T.H. WELLER et F.A. NEVA (304) à Boston et P.D. PARKMAN et E.L. BUESCHER (203) à Washington isolent et cultivent le virus de la rubéole.

A la suite de l'épidémie massive de 1963-64 aux U.S.A, et de la naissance de 20 000 enfants malformés, les travaux se multiplient ; en 1966 H.M. MEYER et P.D. PARKMAN (184) mettent en évidence et dosent les anticorps antirubéoleux par l'application de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination. C'est à cette époque que commence la préparation tant en Europe qu'aux U.S.A. de vaccins à virus atténués.

LE VIRUS DE LA RUBEOLE

I - CLASSIFICATION

La classification de ce virus n'a pas encore été réalisée avec certitude. Tout d'abord considéré comme un paramyxovirus, puis proche des arbovirus, puis comme faisant parti de la famille des Togaviridae, il est considéré actuellement comme se rapprochant du groupe des virus des leucoses aviaires (poids moléculaire de l'ARN, existences de plusieurs glycoprotéines)(302)(196)(51).

II - STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Le virus est composé d'un noyau central de 30 à 35 nm entouré d'une structure membraneuse épaisse comportant de fines projections. Son diamètre total est de 50-70 nm.

C'est un virus à RNA d'un poids moléculaire de 3×10^6 environ, comportant des polypeptides structuraux et plusieurs glycoprotéines. La notion de constituants lipidiques du virus résulte de sa faible densité ($d = 1,18$) et de sa sensibilité aux solvants des lipides, éther, chloroforme, désoxycholate de sodium et détergents. Le RNA viral est infectieux. C'est un virus fragile, facilement inactivé par la chaleur, sensible aux rayons ultraviolets, lyophilisable, se conservant bien à -70°C (302).

III - CARACTERES ANTIGENIQUES

Il n'existe à ce jour qu'un seul type antigénique du virus, établi par séroneutralisation. On peut classer les constituants antigéniques en deux groupes :

- Les constituants associés aux virions dans lesquels on trouve :

- l'antigène mis en évidence par la séroneutralisation (antigène viral)
- L'antigène hémagglutinant (hémagglutinine)
- Un antigène fixant le complément (antigène lourd, de densité 1,18 à 1,23).

- Les constituants qui seraient associés à des subunités de l'enveloppe du virus dans lesquels on classe :

- Un antigène fixant le complément (antigène léger, de densité 1,08)
- Deux antigènes précipitants
- L'antigène mis en évidence par l'agrégation des plaquettes (51)(302).

IV - PROPRIETES CYTOPATHOGENES DU VIRUS

Le virus de la rubéole peu cytopathogène, réalise une infection intracellulaire compatible avec la vie de la cellule. En effet, il peut se multiplier dans la cellule infectée sans la détruire. C'est lors de la division cellulaire que se réalise la transmission de cellule à cellule.

Ces propriétés expliquent que mis en culture sur les cellules couramment utilisées en laboratoire (rein de singe primaire), le virus ne provoque pas de lésions cytopathogènes visibles, ce qui rend difficile son repérage à l'isolement.

Cependant J. et A. BOUE (52) ont montré que sur culture de cellules diploïdes humaines, les mécanismes de division sont perturbés lors de la présence du virus de la rubéole et qu'il existe notamment des cassures chromosomiques.

Ces propriétés cytopathogènes du virus expliquent en grande partie la pathogénie de la rubéole congénitale.

D'autre part, il existe des lignées cellulaires sur lesquelles on note un effet cytopathogène visible, mais non caractéristique :

- effet cytopathogène lent, partiel et inconstant sur les cellules *RK13 (lignée de rein de lapin) *BHK21 (clône 13, rein de Hamster nouveau-né) (24)(223)
- effet cytopathogène plus rapide et total sur les cellules *SIRC (cornée de lapin, véro (lignée de rein de singe cercopithèque)(163)(214)

EPIDEMIOLOGIE

Dans les pays européens, la rubéole semble sévir par petites épidémies géographiquement limitées. Par contre, dans d'autres régions du globe (USA, Australie) on observe de grandes épidémies, apparaissant avec un rythme multiannuel (cinq à dix ans). Les enquêtes sérologiques expliquent partiellement ce phénomène : 9 femmes sur 10 sont immunes après l'âge de 20 ans en France, alors que dans les Iles Hawaï, en 1969 plus de la moitié des femmes était réceptive (51).

Le caractère saisonnier de la rubéole est très net. C'est une maladie qui apparaît à la fin de l'hiver et prend une allure épidémique d'avril à juin.

- | | |
|--------|-------------------------------|
| * RK | Rabbit Kidney |
| * SIRC | Sérum Institute Rabbit Cornea |
| * BHK | Baby Hamster Kidney |

C'est un élément non négligeable de diagnostic, d'autant plus que les autres maladies virales éruptives simulant la rubéole et dues essentiellement aux entérovirus, et quelquefois aux adénovirus sont fréquentes en été et en automne (302).

L'homme est le seul réservoir de virus. La rubéole s'observe à un âge plus tardif que les autres maladies virales communes de l'enfance. L'incidence maximum de la maladie se situe entre 5 et 10 ans, mais elle est fréquente entre 10 et 15 ans.

La transmission se fait par voie aérienne. Le virus est présent dans la gorge du malade pendant environ 15 jours : une semaine avant et une semaine après l'éruption en moyenne. Les travaux sur la rubéole congénitale ont montré que les nouveaux-nés atteints de cette affection représentent une source de contagion très importante pour leur entourage. Dans certains cas, il a été possible d'isoler le virus de la gorge de ces enfants pendant toute la première année (5)(128)(189)(213)

CLINIQUE

I - LA RUBEOLE ACQUISE

A) La forme typique n'est pas la plus fréquente

L'incubation : celle-ci dure de 12 à 18 jours selon les auteurs. Elle est absolument silencieuse (51)(111)(119).

La période d'invasion : Quand elle existe, elle est brève (24 Heures) et seulement marquée par un fébricule, des courbatures ou des adénopathies cervicales. Mais elle est le plus souvent absente, ou les signes qui l'accompagnent sont trop discrets pour attirer l'attention.

La phase éruptive : Elle est caractérisée par la triade classique :

- état subfébrile
- adénopathies cervicales
- éruption maculopapuleuse plus ou moins typique
(21) (301)

1- La fièvre ne dépasse pas 38°5. Elle est inconstante.

2- Les adénopathies sont très fréquentes. Elles peuvent être le seul signe clinique. Elles siègent au niveau des chaînes cervicales postérieures et sous-occipitales rétro-auriculaires. Les autres aires ganglionnaires, jugulo-carotidiennes, prétragiques, axillaires, épitrochléennes, sont plus rarement tuméfiées (111). L'hypertrophie ganglionnaire est surtout nette au moment de l'éruption. Le volume des ganglions ne dépasse pas le volume d'une noisette. Ils sont peu sensibles, la peau qui les recouvre est normale. Ils persistent plusieurs semaines (51).

3- L'exanthème est souvent la première et la seule manifestation de la maladie. Il débute à la face, s'étend en quelques heures à tout le corps sans ordre, sans symétrie, respectant les extrémités. Il est fait de macules fines, rosées, séparées par des intervalles de peau saine, sauf sur les joues et le dos où leur confluence peut donner un aspect scarlatiniforme. Cet exanthème évolue en une seule poussée et disparaît en quelques heures à 3 jours au maximum, sans desquamation ni prurit (119).

A cette triade peuvent s'associer :

- Un exanthème, limité à une rougeur du pharynx, à une discrète conjonctivite,

- Une splénomégalie modérée

- Une discrète leuconeutropénie, mais surtout une plasmocytose dépassant fréquemment 5% de la formule blanche. Mais il s'agit d'un signe qui n'est pas pathognomonique de la rubéole (119)(51).

Enfin, l'évolution de cette forme 'typique est simple, La guérison survenant en quelques jours.

B - Les formes cliniques

1- Les formes inapparentes sont fréquentes. Chez l'enfant, il y aurait à peu près autant de formes inapparentes que de formes éruptives. Chez l'adulte, les formes inapparentes seraient beaucoup plus fréquentes (51).

2- Nous n'insisterons pas sur les formes frustes

3- Les formes compliquées sont rares et se voient le plus souvent chez l'adulte avec :

• quelques manifestations articulaires :

Il s'agit de polyarthralgies, voire de polyarthrites des petites articulations. Elles apparaissent au moment de l'éruption ou dans les cinq jours suivants. Elles peuvent persister une quinzaine de jours sans laisser de séquelles (301).

• Des complications nerveuses :

Il s'agit d'encéphalites, de méningoencéphalites. Contrairement aux complications précédentes, elles sont exceptionnelles, mais peuvent laisser de lourdes séquelles, voire même entraîner la mort (111).

• Des complications hématologiques :

C'est le classique purpura thrombopénique qui survient du 3^e au 15^e jour après l'éruption. Sa fréquence est estimée à 1 pour 3000 rubéoles éruptives. Le chiffre des plaquettes est inférieur à 50 000 avec quelquefois la présence d'auto-anticorps antiplaquettes. Habituellement régressif en quelques semaines, ce purpura thrombopénique peut lui-même se compliquer d'hémorragie cérébroméningée (23).

Ces manifestations sont intéressantes à connaître car on les retrouve dans la rubéole congénitale.

II - LA RUBEOLE CONGENITALE

C'est l'atteinte du produit de conception in utéro consécutive à une infection rubéolique maternelle, apparente ou non, survenue au cours du premier trimestre ou plus rarement au cours du deuxième trimestre de la grossesse. Cette atteinte peut se traduire par des manifestations très diverses dont l'ensemble constitue le syndrome de rubéole congénitale.

A) Le syndrome de rubéole congénitale

1- Avortement spontané (247)(96)

D'après SALLOMI (U.S.A 1966), dans le cas d'une infection rubéolique au cours des deux premiers mois de la grossesse, le nombre d'avortements spontanés est supérieur à celui des enfants malformés.

2- Séquelles malformatives (ou embryopathies rubéoliques).

Ce sont ces séquelles que GREGG en 1941 (122) puis plus complètement SWAN en 1943 ont été les premiers à décrire (286).

Ces séquelles sont isolées ou plus souvent associées, elles se révèlent à la naissance ou plus tardivement. Il s'agit :

• de malformations oculaires (301)

- la cataracte : lésion la plus fréquente, de type nucléaire. Bilatérale dans les 2/3 des cas, elle nécessite une intervention chirurgicale précoce dès le sixième mois pour éviter tout retard de développement psychique.
- la microphthalmie avec diminution du champ visuel est rarement bilatérale.
- Le glaucome congénital, plus rare nécessite également une intervention chirurgicale précoce.
- enfin on peut trouver :
 - un flou cornéen transitoire
 - une rétinopathie avec alternance de zones pigmentées et dépigmentées de la région périmaculaire. D'après Kresby (155) elle signerait l'embryopathie rubéolique.

• de lésions de l'appareil cochléaire (34)(62)(301)

Ces lésions se traduisent par une surdité de perception, dont le diagnostic est souvent tardif. Elles représenteraient d'après COOPER 18% des surdités congénitales.

o de malformations cardiaques (29, 131, 301)

On note surtout :

- la persistance du canal artériel
- des anomalies septales
- une atteinte du système artériel pulmonaire
- la coarctation de l'aorte
- les myocardiopathies sont plus rares mais de pronostic sévère.

Ces malformations cardiaques ne ~~pe~~représentent cependant que 2% de l'ensemble des cardiopathies congénitales.

o de lésions du système nerveux central (78)(153)(301)(236)

- le retard mental ne pourra être apprécié qu'au bout de plusieurs années (sur 357 cas, 44% présentaient un retard psychomoteur d'après COOPER).
- la microcéphalie donne des signes diffus non spécifiques à l'électroencéphalogramme.
- enfin ces lésions du système nerveux central peuvent se traduire par des convulsions.

o D'autres anomalies plus rares ont été décrites (301)

- anomalies dentaires
- anomalies des dermatoglyphes (1) (275) caractérisées par
 - o le pli de Sydney (extension du pli palmaire proximal transverse jusqu'au bord cubital de la main) d'après SCHUBENBERG
 - o une plus grande fréquence des tourbillons digitaux d'après PARNIS et SMITH
- anomalies chromosomiques (96)(52)

3- Manifestations néonatales diverses

Isolées ou plus souvent associées aux séquelles précédentes, elles réalisent une véritable rubéole congénitale aiguë évolutive (119).

- Le purpura thrombocytopénique serait la manifestation la plus caractéristique (226).

Il s'agit d'un purpura de type pétéchiial, transitoire mais pouvant entraîner la mort par hémorragie cérébroméningée.

- Nous ne ferons que citer les autres manifestations

- hépatite cholostatique avec ictère néonatal
- hépatosplénomégalie
- anémie hémolytique ou hypoplastique
- myocardite
- pneumonie interstitielle
- encéphalite, méningoencéphalite
- anomalies osseuses métaphysaires (alternance longitudinale de bandes claires et sombres), réversibles en quelques mois, non pathognomoniques.

Ces anomalies sont le plus souvent transitoires mais elles peuvent néanmoins être mortelles (15 à 30% des cas).

- Enfin la dysmaturité (119-301-78) est presque constante.

L'hypotrophie staturo-pondérale serait présente dans 2/3 des cas et persisterait souvent plusieurs années après la naissance d'après COOPER.

B) Etude statistique des malformations foetales et des manifestations néonatales

La contamination foetale par le virus de la rubéole peut entraîner :

- un avortement spontané
- la naissance d'un enfant malformé ou mort né
- mais aussi la naissance d'un enfant indemne.

Il est donc intéressant de connaître d'une part le risque de donner naissance à un enfant malformé que présente une femme atteinte de rubéole pendant les premiers mois de sa grossesse (tableau n° 1) ; d'autre part quelles sont par ordre de fréquence les malformations que l'enfant risque de présenter (tableau n° 2).

Si les atteintes foetales sont surtout importantes au cours du premier trimestre de la gestation, on pense actuellement qu'il peut survenir une atteinte foetale pendant le second trimestre de la grossesse. Les malformations sont plus rares, moins évidentes, mais cependant sévères (57)(170) (187 bis).

TABLEAU N° 1 - THESE DEC. VIRIEUX (301)

Etude statistique de la fréquence de l'atteinte
foetale suivant l'âge de la grossesse

Auteurs	1e mois de grossesse	2e mois de grossesse	3e mois de grossesse	Moyenne
STROM	11,10 %	11,50 %	7,90 %	10,20 %
& SEROR				55,00 %
ON	15,60 %	19,70 %	13,00 %	16,10 %
HEGGIE -(51)	54,80 %	31,40 %	7,00 %	31,10 %
OMI	60,90 %	26,40 %	7,90 %	31,70 %
R	50,00 %	22,00 %	6,00 %	26,00 %
& KEIR	60,00 %	33,00 %	33,40 %	42,10 %
TMANN	50,00 %	55,50 %		
BRUN				28,00 %
. H.				31,00 %

Les chiffres varient donc suivant les auteurs de 10,20% à 55%. Ce risque est loin d'être négligeable quel que soit l'auteur. Il diminue significativement du 1er au 3e mois de gestation.

TABLEAU N° 2

Fréquence des principales manifestations de la rubéole congénitale chez 306 malformés suivis pendant quatre ans.
(d'après L.Z. COOPER) cité par A. BOUE (51).

Anomalie	Nombre de cas	Pourcentage
Surdité	252	82,30 %
Anomalies		
- oculaires	267	87,20 %
- rétinopathie seule	147	
- cataracte unilatérale	50	
- " bilatérale	58	
- glaucome	12	
Cardiopathie	182	59,40 %
Retard psychomoteur	170	55,50 %
- faible	84	
- moyen	40	
- profond	46	
Purpura	85	27,70 %
Mort	61	19,90 %

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

I - LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Celui-ci repose sur l'isolement du virus, les examens sérologiques, les examens immunologiques.

A) L'isolement du virus

1- Le prélèvement

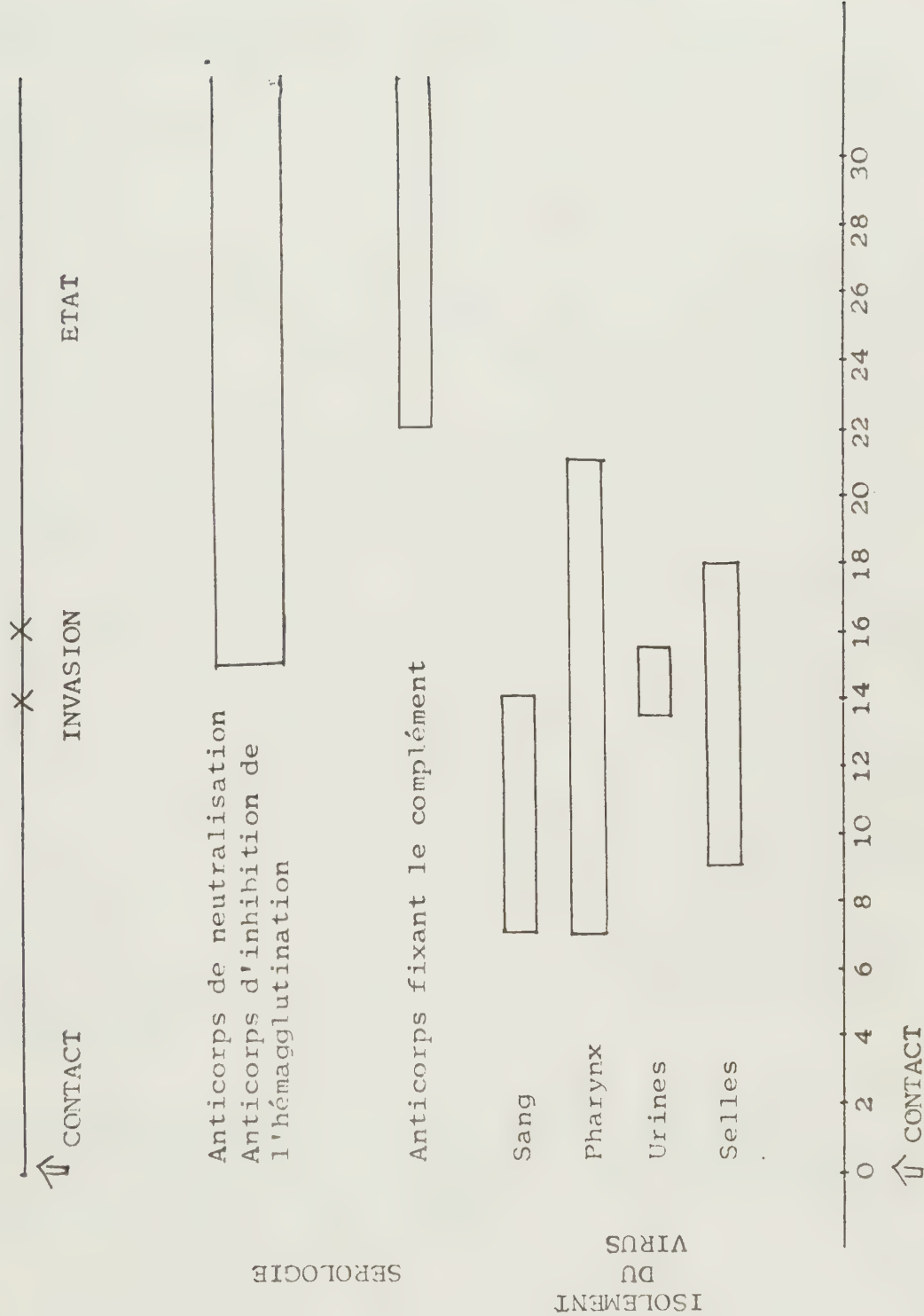
- Dans la rubéole acquise, le prélèvement pourra être constitué par le sang, les leucocytes, les urines, mais surtout l'écouvillonnage de gorge et des fosses nasales. L'évolution de la localisation du virus au cours de la rubéole est indiquée dans le tableau n° 3.

- Dans la rubéole congénitale, le virus a pu être mis en évidence, soit au niveau du placenta et du liquide amniotique, soit au niveau de tous tissus embryonnaires recueillis dans les interruptions de grossesse (en particulier cornée) soit enfin à partir de prélèvements effectués sur l'enfant depuis la naissance jusqu'à un an, parfois plus (gorge, urine, LCR)

2- Les techniques

En raison de la fragilité du virus, il est presque nécessaire, si l'on veut obtenir des résultats satisfaisants, d'inoculer le prélèvement sur cellules au lit du malade. Toutefois, en cas d'impossibilité, on peut recueillir le prélèvement en solution de Hanks ou en milieu de Parker contenant outre des antibiotiques, 1% d'albumine bovine. Le prélèvement sera alors transporté entouré de glace, voire congelé dans de la carboglace.

Evolution de la localisation du virus
de la réponse sérologique
au cours de la rubéole



a) La technique indirecte ou d'interférence (203)(196)

Le virus de la rubéole ne provoque directement aucun effet cytopathogène visible sur les cultures de cellules habituelles, rein de singe primaire en particulier. Cependant il inhibe le développement d'un virus couramment cytopathogène lorsque les deux virus sont inoculés dans le même tube de culture cellulaire. Il s'agit donc d'un système indirect d'interférence. Le prélèvement est inoculé dans des tubes de cellules rénales de singe cercopithèque. Après 9 ou 10 jours d'incubation, une partie des tubes est surinfectée par l'Entérovirus-test, ECHO 11 ou Coxsackie A9. Si l'on n'observe pas d'effet cytopathogène (alors que les cellules-témoin inoculées avec le seul virus-test sont détruites), on peut en déduire la présence dans le prélèvement initial d'un virus interférant, qu'il s'agit maintenant d'identifier comme étant un virus rubéoleux. Pour ce faire, on réalise l'opération suivante : inoculation sur cellules du mélange virus isolé-sérum antirubéoleux. Après 9 ou 10 jours de contact, surinfection par l'Entérovirus-test. Si l'on observe par la suite un effet cytopathogène de type Entérovirus, on peut en conclure qu'il y a eu levée de l'interférence, donc que le virus isolé est bien un virus rubéoleux, puisque neutralisé spécifiquement par le sérum antirubéoleux.

b) La technique directe (24)(163)(171)(196)(214)(223)

Dans des conditions particulières, le virus de la rubéole manifeste un effet cytopathogène.

Les cultures de cellules utilisées sont les cellules de lignée RK 13 (rein de lapin) Véro (rein de cercopithèque) et SIRC (cornée de lapin). Malheureusement lors du premier prélèvement l'effet cytopathogène n'existe pas ou est gêné par la toxicité du prélèvement pour ces cellules fragiles. Il faut donc souvent plusieurs repiquages pour arriver à mettre en évidence le virus.

En conclusion, l'isolement du virus de la rubéole est une technique coûteuse, délicate, longue (le résultat ne peut guère être donné en moins d'un mois) qui ne peut être pratiquée que par un laboratoire spécialisé. La seule indication clinique où l'isolement paraît nécessaire est celle d'un nouveau-né malformé où il permettrait d'affirmer sans conteste une rubéole congénitale.

B) Les techniques sérologiques

1- La réaction de neutralisation (44)(102)(196)(302)

Les anticorps testés apparaissent le jour de l'éruption ou peu après, ils sont à un titre maximum au bout d'un mois, pour diminuer lentement mais persister toute la vie à un titre faible supérieur ou égal à 4. Il existe deux méthodes de détection de ces anticorps.

a) La méthode indirecte ou d'interférence

A l'aide d'une dilution de virus rubéoleux contenant une dose connue de virus surinfectant, on recherche pour quelle dilution du sérum testé on obtient sur des cellules sensibles, une neutralisation du pouvoir interférent. Les systèmes les plus souvent utilisés sont :

- des cellules de singe cercopithèque avec comme virus surinfectant Echo 11 ou Coxsackie A9.
- des cellules diploïdes humaines (Wi38) et le virus Sindbis.

Cette méthode est presque aussi longue et délicate que celles qui permettent l'isolement du virus. Les titres d'anticorps décelés sont faibles (entre 4 et 128).

b) La méthode directe

On dispose d'un virus adapté, de haut titre, donnant un effet cytopathogène net et rapide. On met en présence une suspension de ce virus contenant dix à trente doses infectieuses 50% et les dilutions de deux en deux du sérum à tester. Le mélange est inoculé sur des tubes de cultures cellulaires (cellules RK 13, Véro, ou SIRC). Du troisième au huitième jour, on fait la lecture de l'inhibition de l'effet cytopathogène. On peut mesurer ainsi le titre des anticorps neutralisants.

Cette technique est un peu plus rapide (7 à 8 jours). Elle donne des résultats fidèles et reproductibles. Mais les titres d'anticorps décelés sont faibles et de plus elle est très difficile à réaliser sur une grande échelle car elle demande des lecteurs bien entraînés, l'effet cytopathogène étant souvent peu net.

2- D'autres méthodes ne méritent que d'être citées.

a) le titrage des anticorps fixant le complément (269) (283)

Les anticorps fixant le complément apparaissent vers le 10ème à 15ème jour après l'éruption pour disparaître en 1 à 3 ans. Ces anticorps se développent mal chez certains individus. C'est dire déjà les limites de cette technique. Il faut encore ajouter d'autre part que l'antigène est très difficile à préparer de façon régulière.

b) Le titrage des anticorps par immunofluorescence indirecte

Cette technique a été développée par BROWN et ses collaborateurs (56). On dispose d'un virus rubéoleux donnant un effet cytopathogène net rapide. On met en présence ce virus et une culture cellulaire sensible (cellules RK 13, Véro ou SIRC). Lorsque l'on observe un effet cytopathogène, on fixe la préparation à l'acétone. On incube ensuite des dilutions de deux en deux, du sérum à tester, en chambre humide, sur l'antigène figuré - culture cellulaire infectée. Enfin on rajoute sur la préparation un antiserum fluorescent antigammaglobulines humaines. La dernière dilution qui donne au microscope à fond noir une fluorescence nette permet de déterminer le titre du sérum.

Si cette technique a l'avantage de la rapidité (2 heures), le titre d'anticorps concernés est rarement supérieur à 64, les antigènes utilisés sont très fragiles. Elle peut être difficilement utilisée dans un but de diagnostic de routine.

3- Le titrage des anticorps inhibant l'héماغglutination

C'est la technique classique utilisée dans tous les laboratoires de sérologie virale. Nous l'étudierons en détail plus loin, aussi nous ne ferons que citer ses principaux avantages : la sensibilité : les titres d'anticorps sont dix fois plus élevés que dans la séroneutralisation avec des résultats superposables; la spécificité, la fidélité, la reproductibilité, la rapidité (24 à 48 heures), la possibilité d'utiliser un antigène non infectieux en traitant la suspension virale au Tween-Ether pour extraire l'héماغglutinine (NORRBY)(198 bis).

C) Les examens immunologiques

Il s'agit de réaliser un fractionnement des anticorps en vue de séparer les immunoglobulines M (IgM), macroglobulines d'apparition précoce et de durée de vie courte, 5 à 6 semaines, et les immunoglobulines G (IgG) de plus faible poids moléculaire et persistant indéfiniment (fig. n° 4). La découverte d'anticorps spécifiques de type IgM est un signe de quasi certitude de primo-infection. Différentes techniques de séparation des IgG et des IgM ont été proposées :

- l'utilisation du dimercapto-ethanol (227)

Le dimercapto-éthanol dénature les IgM en laissant intactes les IgG. Cependant, on s'est aperçu que cette méthode manquait de précision et de régularité. Elle expose à des résultats erronés et des interprétations dangereuses. Cette technique est actuellement abandonnée.

- l'utilisation d'antiglobulines spécifiques anti IgG (227)

La précipitation complète de la classe d'immunoglobulines considérée ne se produit que pour des rapports précis et étroits des réactifs (zone d'équivalence). Elle n'est donc pas très sûre actuellement.

- Le test de Remington (78 bis)

Il s'agit du titrage des anticorps IgG et IgM par immuno-fluorescence indirecte à l'aide d'antisérums fluorescents anti IgG et anti IgM. Le principe de la technique a été décrit précédemment. Cette technique est actuellement peu utilisée car elle donne des résultats rapides, mais souvent peu fiables.

- l'ultracentrifugation du sérum en gradient de densité de saccharose est une des méthodes donnant satisfaction et utilisée dans de nombreux laboratoires (82)-(227).
- la séparation des Immunoglobulines par gel filtration sur Sephadex G 200 est une technique qui utilise le principe de la chromatographie d'exclusion. Elle a ses défenseurs et est également très utilisée (109)

En pratique, on obtient une série de tubes contenant chacun une fraction du sérum à analyser, chacune de ces fractions contenant plus ou moins d'IgG ou d'IgM suivant la zone où elle a été recueillie. La réaction d'inhibition de l'héماغglutination permet de déterminer si les IgG et les IgM obtenues correspondent bien à des anticorps spécifiques de la rubéole. C'est redire l'importance de la réaction d'inhibition de l'héماغglutination.

II - QUELQUES APPLICATIONS PRATIQUES

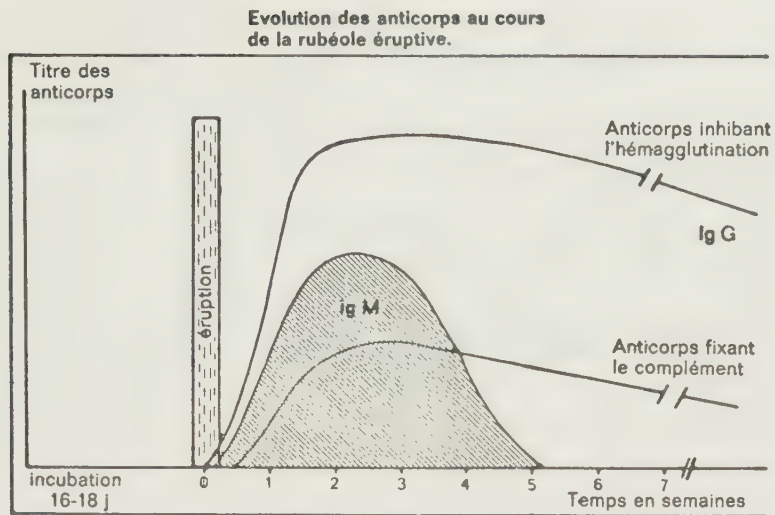
A) Dans le cas de suspicion d'une rubéole congénitale (114)(196)(301)(302)

Les arguments cliniques sont toujours insuffisants pour affirmer une rubéole congénitale, même s'il existe des malformations multiples. En effet la syphilis congénitale, la toxoplasmose, la maladie des inclusions cytomégaliqes peuvent simuler la même symptomatologie.

- A la naissance

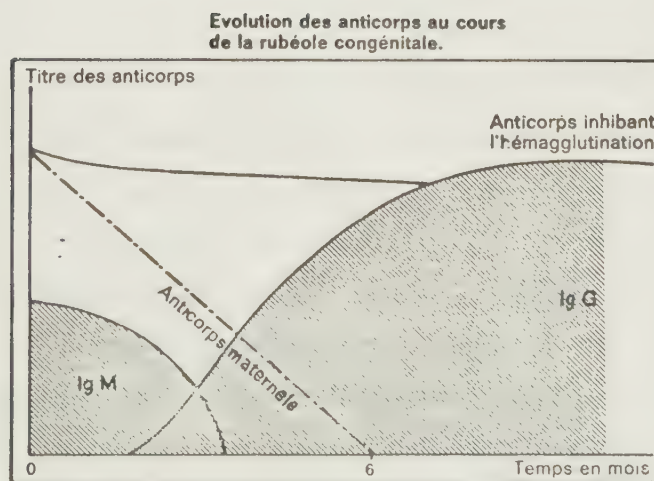
- . On recherche la présence de virus dans la gorge et dans les urines. Le virus peut être retrouvé dans 90% des cas.

Graphique n° 4



D'après Virologie à l'usage des étudiants en médecine
7e édition 1975 (302)

Graphique n° 5



D'après Virologie à l'usage des étudiants en Médecine
7e édition 1975 (302)

- Une sérologie par inhibition de l'hémagglutination est pratiquée à la mère et à l'enfant. Le titre des anticorps dans le sang du cordon est égal voire supérieur à celui de la mère. Mais surtout il existe à la fois des IgG et des IgM. Or l'enfant ne sait synthétiser que des IgM et ceux-ci ne franchissent pas la barrière placentaire. Donc la présence d'IgM signe une rubéole congénitale. La présence d'IgG traduit le passage d'IgG maternels à travers la barrière placentaire.

- Au cours de la première année

Si la sérologie n'a pas été pratiquée à la naissance, l'évolution des anticorps est significative (tableau n° 5). Les IgM ne sont pas retrouvées. Mais les IgG persistent au-delà de 6 mois. Ces IgG sont alors fabriquées par l'enfant et prennent le relai des IgG maternelles, lesquelles disparaissent normalement vers l'âge de 6 mois.

La persistance d'IgG spécifiques au-delà de 6 mois est en faveur d'une rubéole congénitale.

B) Devant une maladie éruptive - Le problème des réinfections (82)(51)(302) - (82)(227)

Il est très souvent difficile, voire dangereux, d'affirmer une rubéole seulement sur des signes cliniques. En effet, si classiquement, certaines rougeoles, certaines scarlatines ou l'exanthème subit peuvent prêter à confusion, c'est surtout les éruptions dues aux entérovirus et aux adénovirus qu'il sera difficile de distinguer de la rubéole. Là encore, il faut avoir recours aux examens biologiques et c'est à la réaction d'inhibition de l'hémagglutination seule que l'on fait appel:

Une augmentation significative du titre des anticorps constatée sur 2 sérums prélevés à 15 jours d'intervalle (le premier au moment de l'éruption) permet d'affirmer avec une très forte probabilité, une rubéole. La possibilité d'une réinfection reste possible. Dans ce cas, on observe également une augmentation du titre des anticorps sur les deux sérums prélevés à 15 jours d'intervalle, par suite d'un effet de rappel (réaction anamnétique). La réinfection entraîne la fabrication d'IgG et jamais celle d'IgM. Seul, semble-t-il le dosage des IgM spécifiques permettrait de trancher entre rubéole primaire et réinfection. Cependant le fractionnement des immunoglobulines n'étant encore un examen réalisable que par un petit nombre de laboratoires, et fort coûteux, le dosage des IgM n'est réalisé que lorsque le diagnostic formel de rubéole doit être posé.

C'est ce qui arrive bien souvent dans les exemples du chapitre suivant. Il faut encore ajouter qu'en cas de réinfection, il n'y a jamais de malformations du produit de conception, dans l'état actuel de nos connaissances.

C) Rubéole et Grossesse (82)(108)(227)

1- Dans le cas d'une éruption

Lorsque l'état immunitaire de la femme avant l'éruption est connu, le diagnostic est facile.

- en cas de sérologie ancienne positive, il ne peut s'agir d'une éruption rubéolique.
- en cas de sérologie ancienne négative, si les nouvelles sérologies (l'une précoce, l'autre quinze jours plus tard) restent négatives, il ne peut s'agir d'une éruption rubéolique. Mais si une des nouvelles sérologies revient positive on peut affirmer qu'il s'agit d'une éruption rubéolique.

RUBEOLE ET GROSSESSE

Cas d'une éruption chez une femme enceinte, l'immunité rubéolique

avant l'éruption n'étant pas connue

Prélèvement précoce		Prélèvement 15 jours plus tard		Résultat
Sérologie	Immunologie	Sérologie	Immunologie	
réaction d'IHA	Recherche d'IgM	réaction d'IHA	recherche d'IgM	
-	inutile	-	inutile	Eruption non rubéolique
		+	inutile	rubéole primaire
+	-	+	-	Immunité acquise ancienne
+	+		inutile	rubéole primaire
Premier prélèvement tardif		Immunologie		Résultat
Sérologie		recherche d'IgM spécifique		
réaction d'IHA				
-		inutile		Eruption non rubéolique
+		+		rubéole primaire
+		-		rubéole primaire ?
				Immunité acquise ancienne ?

Nous avons résumé succinctement dans le tableau n°6 les différents cas pouvant se présenter lorsque l'état immunitaire de la femme avant l'éruption n'est pas connu. Lorsque l'on dispose d'un prélèvement précoce, il est toujours possible de porter un diagnostic de certitude (avec parfois l'aide des résultats sérologiques et immunologiques d'un deuxième prélèvement réalisé 15 jours plus tard). Par contre lorsqu'on ne dispose que d'un prélèvement tardif, si la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (I.H.A.) est positive, et la recherche d'IgM spécifique négative, il n'est pas toujours possible de trancher entre immunité acquise ancienne et rubéole primaire avec disparition précoce des IgM.

2- Cas d'un simple contage

Lorsque l'état immunitaire de la femme avant le contage est connu, le diagnostic est facile

- en cas de sérologie ancienne positive, tout risque de rubéole primaire est écarté.
- en cas de sérologie ancienne négative, il suffit de réaliser deux sérologies (une précoce et une quinze jours plus tard). Si ces deux sérologies restent négatives il n'existe pas de rubéole primaire ; si le deuxième examen est positif il existe une rubéole primaire récente.

Nous avons résumé succinctement dans le tableau n° 7 les différents cas pouvant se présenter lorsque l'état immunitaire de la femme avant le contage n'est pas connu. Si la date du contage est déterminée, les examens sérologiques (réalisés sur un prélèvement précoce et parfois sur un prélèvement 15 jours plus tard) permettent presque toujours un diagnostic de certitude.

Si la date du contage est indéterminée, (c'est souvent le cas

Cas d'un simple contagé, l'immunité rubéolique avant le contagé

n'étant pas connue

Prélèvement précoce réalisé moins d'une semaine après le contagé	Prélèvement 15 jours plus tard	RESULTAT
Sérologie	Sérologie	Immunologie
Réaction d'IHA	réaction d'IHA	Recherche d'IgM
-	-	inutile
	+	inutile
		Rubéole primaire
+		inutile
		Immunité acquise ancienne

La date de contagé est indéterminée

Premier prélèvement	Prélèvement 15 jours plus tard	RESULTAT
Sérologie	Sérologie	Immunologie
Réaction d'IHA	réaction d'IHA	recherche d'IgM
-	-	inutile
		Réceptivité mais contact non contaminant
	+	inutile
		Rubéole primaire
+		inutile
		Rubéole primaire
+	+	Réinfection ?
		Rubéole primaire ?
		Immunité ancienne ?

lors des expositions quasi permanentes: personnel soignant, enseignants) lorsque deux sérologies à quinze jours d'intervalle sont positives alors que la recherche d'IgM spécifiques est négative, il est impossible de trancher avec certitude entre : une immunité acquise ancienne (dans ce cas cependant les réactions sérologiques restent identiques d'un examen à l'autre), une réinfection (dans ce cas cependant on observe volontiers une différence entre les résultats d'un examen sérologique à l'autre), enfin une rubéole primaire (avec disparition des IgM).

Ainsi si l'on connaît l'état immunitaire de la mère avant le contagé ou avant l'éruption, il n'y a aucun problème diagnostique. Si l'on ne connaît pas cet état immunitaire, le dosage précoce est capital. Si ce premier dosage n'est pas fait à temps, le diagnostic de certitude peut ne pas exister.

D) Le contrôle systématique de l'Immunité Rubéolique
(196)(301)

Nous venons de voir son importance. La technique de l'inhibition de l'héماغglutination permet actuellement de le réaliser dans des conditions satisfaisantes. Un titre d'anticorps de 10 ou supérieur permet d'affirmer qu'il y a eu contact avec le virus rubéoleux. Néanmoins, par mesure de précaution, il est recommandé de considérer que seuls les titres de 40 ou plus sont protecteurs. Un titre inférieur à 10 permet d'affirmer la réceptivité de l'intéressé.

PROPHYLAXIE

Comme il n'existe pas de traitement de la rubéole, maladie virale, les mesures prophylactiques revêtent une importance capitale.

I - PROPHYLAXIE PAR LA VACCINATION

A) Les vaccins (45, 71 bis)

Les vaccins inactivés essayés jusqu'à présent ne permettent pas d'obtenir un degré d'immunité suffisant. Ils auraient l'avantage de pouvoir être utilisés sans risque chez une femme enceinte. Les seuls vaccins efficaces sont des vaccins atténués. L'atténuation se réalise au cours de passage successifs sur cultures cellulaires. Trois grandes souches existent :

- La souche HPV 77 (High Passage Virus 77) de PARKMANN et coll.
Elle est obtenue après 77 passages du virus rubéoleux sur culture de rein de singe. Elle n'est pas utilisée en France en raison des risques de complication qui peuvent suivre la vaccination (arthralgies, myéloradiculonévrites).
- La souche CENDEHILL de PEETERMAN et HUYGELEN
Elle est obtenue à partir du virus sauvage isolé sur cellules de rein de cercopithèque, atténué par 51 passages sur cellules rénales de lapin.
- La souche PLOTKIN ou WISTAR RA 27/3
Elle est obtenue à partir de virus sauvage isolé directement. L'atténuation se fait par passages successifs sur cellules diploïdes humaines WI38 provenant de poumon foetal.

Les vaccins disponibles en FRANCE sont :

- Le Rudivax^R (souche RA 27/3 de PLOTKIN)
- Le Ercevax^R (souche CENDEHILL)

C'est la voie sous-cutanée qui donne les meilleurs résultats. De nombreuses associations sont possibles avec le vaccin de la rougeole et le vaccin triple associé Diphtérie-Tétanos-Coqueluche en particulier.

Ces vaccins donnent une infection cliniquement inapparente suivie de l'apparition d'anticorps spécifiques. Il n'y a aucun risque de contagion. Ils sont efficaces car on obtient une apparition d'anticorps spécifiques dans plus de 95% des cas. La stabilité du titre des anticorps observés permet, malgré le faible recul dont on dispose, de supposer que la protection sera de longue durée. Les réinfections sont possibles, renforçant l'immunité.

L'absence de pouvoir tératogène des souches atténuées n'a pu être démontré. Ceci conduit à proscrire l'utilisation du vaccin contre la rubéole chez une femme qui pourrait être au début d'une grossesse ou devenir enceinte dans les semaines suivant la vaccination.

B) La vaccination (114)

1- Deux politiques de vaccination de masse ont été proposées.

- La vaccination systématique précoce de toute la population infantile.

C'est la méthode préconisée par les auteurs américains, le but étant l'éradication de la maladie en transformant les jeunes enfants réceptifs en sujets résistants. Mais il n'est pas exclu que des sujets vaccinés de longue date ne deviennent porteurs de virus à la faveur d'une baisse de l'état immunitaire.

- La vaccination de toutes les adolescentes de 12 à 14 ans.
C'est celle qui est retenue dans la plupart des pays européens.
Elle a l'avantage de permettre à l'immunité naturelle de se développer chez un grand nombre de femmes et d'assurer une bonne immunité à celles qui ne la possédaient pas, peu de temps avant la période où elles peuvent être enceintes.

2- Problème de la vaccination des femmes en âge d'avoir des enfants

C'est le cas se posant le plus fréquemment de nos jours. Il faut pratiquer un test sérologique, la vaccination n'étant réservée qu'au petit pourcentage de femmes réceptives. Une contraception orale pendant 3 mois (1 cycle avant, 2 cycles après la vaccination) est nécessaire.

II - LES AUTRES MOYENS DE PROPHYLAXIE

A) Les mesures générales avant tout contact (51)

Elles reposent sur l'éloignement des sources de contact de toutes les femmes réceptives. L'arrêté du 14 mars 1970 (J.O. du 7 avril 1970) précise ces dispositions :

Art. 4 : Dès qu'un cas de rubéole se déclare dans un établissement d'enseignement ou d'éducation public ou privé relevant du Ministre de l'Education Nationale, le personnel féminin doit en être informé. Une autorisation d'absence, ne pouvant excéder le début du 4ème mois de grossesse est alors applicable sur leur demande à tous les membres du personnel féminin présentant un test sérologique négatif de rubéole.

B) Les injections de gammaglobulines après le contage

Ce n'est que dans des conditions particulières que les gammaglobulines peuvent avoir une action protectrice : lorsque le contage est précis et très récent (moins de 3 jours) l'injection de gammaglobulines s'impose (de préférence gammaglobulines spécifiques, dont le titre vis à vis du virus de la rubéole est connu) à doses élevées 20 à 30 ml (séro-abortion) (51).

Ceci n'excluera pas une recherche d'anticorps sur un sérum précoce avant injection de gamma-globulines et un sérum recueilli 20 jours plus tard : les anticorps contenus dans les gammaglobulines sont alors trop faibles pour être dosés et fausser les réactions sérologiques.

Dans tous les autres cas, l'injection de gammaglobulines ne peut qu'empêcher l'éruption de se manifester (séro-atténuation).

C) L'avortement thérapeutique

Il reste l'ultime recours lorsque une femme enceinte de moins de 12 semaines présente une rubéole certaine. Il nous paraît cependant utile d'illustrer ce paragraphe à l'aide d'une observation citée par A. FRIBOURG-BLANC (108)

"L'enfant X... âgé de 2 ans, présente le 13 août 1971, un état fébrile éruptif. Un médecin consulté diagnostique catégoriquement une rubéole sans investigation hématologique, ni sérologique préalable. Lors de cet épisode la mère ignore encore qu'elle est enceinte et n'en acquiert la certitude que fin septembre. Inquiète, elle demande le 26-9 un premier titrage des anticorps rubéoliques : il donne un titre de 1/256 ; un deuxième titrage le 12-10, effectué dans le

même laboratoire, s'élève à 1/1024 avec la conclusion : infection rubéolique récente. Affolement, préparatifs d'avortement, scrupules d'un médecin qui demande un nouveau titrage. Pratiqué le 9-11, il s'avère à 320 et se confirme identique le 23-11. L'inquiétude de la mère ne sera complètement calmée que par l'absence d'anticorps rubéoliques chez l'enfant victime de l'éruption en août".

En conclusion :

Les techniques de laboratoire et en particulier la réaction d'inhibition de l'hémagglutination sont d'un appoint capital dans le diagnostic de la rubéole, mais leur réalisation n'est pas dépourvue de risques d'erreur.

Les résultats doivent être interprétés avec rigueur avant que l'on puisse poser un diagnostic de certitude.

CHAPITRE II

LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION (I.H.A)

C'est aux U.S.A. en 1966, dans le laboratoire du National Institute of Health que STEWART (G.L), PARKMAN (P.D.) MEYER (H.M.) (284) mettent en évidence le pouvoir hémagglutinant du virus de la rubéole.

I - PRINCIPE DE LA REACTION

Le virus de la rubéole présente de nombreuses analogies avec certains arbovirus. Or les arbovirus possèdent la propriété d'agglutiner les érythrocytes de différentes espèces d'oiseaux. La réaction d'I.H.A. appliquée au virus de la rubéole est une adaptation des techniques déjà connues pour les arbovirus. L'hémagglutination obtenue en mettant en contact le virus de la rubéole et des érythrocytes aviaires peut être inhibée spécifiquement par le sérum des individus ayant eu la rubéole.

II - LA TECHNIQUE DE LA REACTION

La réaction comprend trois parties :

- le traitement des sérums à examiner,
- le titrage des antigènes
- l'inhibition proprement dite.

Différentes techniques existent. Elles comportent toutes ces trois étapes. Les différences essentielles entre ces techniques résident dans le choix des réactifs et dans le mode de traitement des sérums à examiner.

Nous étudierons donc successivement :

- les différents réactifs
- les différents modes de traitement des sérums.

Puis nous décrirons les trois étapes, communes à toutes les techniques, sur le plan pratique, en prenant comme type de description la technique utilisée à l'Institut Pasteur de Lyon.

A) Les réactifs

1- L'antigène

L'antigène hémagglutinant est obtenu par culture du virus. Toutes les souches du virus de la rubéole semblent convenir. La culture se fait le plus souvent sur la lignée cellulaire BHK 21, constituée par des cellules de rein de hamster nouveau-né, transformées en lignée (STOKER et MACPHERSON). La sensibilité de ces cellules pour le virus de la rubéole a été démontrée par VAHERI (294). Un traitement au Tween-Ether (NORRBY) (198 bis) permet d'obtenir une hémagglutinine stable et dépourvue de pouvoir infectieux. L'hémagglutinine est conditionnée dans le commerce sous forme lyophilisée en flacon. Elle est reconstituée par adjonction d'eau distillée. En France, plusieurs hémagglutinines spécifiques sont commercialisées.

2- Les tampons

a) Le D.G.V (Dextrose-Gélatine-Véronal ou G.G.B (Glucose-Gélatine-Barbital)

C'est le tampon qui a été le premier utilisé (284). Il servait dans les réactions d'hémagglutination des Arbovirus. Ce tampon n'est plus utilisé dans la réaction proprement dite en raison de son pH, mais il sert encore à laver les érythrocytes aviaires et à les conserver éventuellement.

Son pH est de 7,2, sa conservation est effective à +4°C et sa composition est la suivante :

Barbital.....	0,58 g	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,12g
Gélatine	0,60 g	NaCl.....	8,50g
Barbital Sodique	0,38 g	Glucose	10 g
CaCl ₂ anhydre	0,02 g	H ₂ O	QSP. 1000ml

b) Tampon alcalin et tampon acide

HALONEN et coll. (126) montrent en 1967 que l'antigène hémagglutinant est stable à pH alcalin, le pH idéal étant 9. D'autre part, ils montrent que pour obtenir une réaction optimale d'inhibition de l'hémagglutination le pH du milieu doit se trouver entre 6 et 6,5. A partir de ces deux données, ils préconisent l'utilisation d'un tampon pH 9 dans les étapes préliminaires de la réaction, puis l'adjonction d'un tampon acide qui ramène le pH à 6,2 lors de la réaction d'I.H.A. A l'Institut Pasteur de Lyon, ces deux tampons ont la composition suivante(180) :

• Le tampon alcalin pH 9 B.A.B.S. (Bovalbumine Borate Saline)

NaCl.....	7,02 g
H2 BO3	3,09 g
NaOH - N	24 ml
Fraction V d'albumine bovine	4 g
H2O	Q.S.P.1000 ml

Le pH est ajusté avec une solution de soude sous contrôle au pHmètre. La conservation de ce tampon se fait à 4°C. Pour l'adsorption des sérums par la technique au kaolin, on l'utilise sans albumine bovine.

• Le tampon acide.

Son pH est calculé de manière qu'après mélange à parties égales avec le tampon alcalin, le résultat soit de 6,2. Sa conservation se fait à 4°C.

Sa composition est la suivante :

NaCl	8,7 g
Na2HPO4, 12 H2O	15,75 g
NaH2PO4, anhydre	24,34 g
H2O	Q.S.P 1000 ml

c) Le tampon H.S.A.G. (HEPES SALINE ALBUMIN GELATIN)

Ce tampon est utilisé actuellement dans de nombreux laboratoires surtout aux U.S.A. Sa formule résulte des travaux de LIEBHABER (168). Celui-ci montra en 1970 que à 4°C et dans le tampon H.S.A.G., l'hémagglutinine traitée au Tween-Ether était stable pendant 12 heures. Ce temps pendant lequel l'hémagglutinine reste stable est compatible avec la durée de la réaction d'I.H.A.

Ce tampon, de pH 6,2 qui se conserve à 4°C, a la composition suivante :

HEPES (Acide N-2 hydroxy-éthyl-pipérazine N'2 éthane sulfonique).....	0,025 M	(25 ml en sol.molaire
NaCl	0,14 M	8,19 g/l
CaCl ₂	0,001M	0,11 g/l
Gélatine	0,00025%	0,0025g/l
Albumine bovine	0,5 %	5 g/l

CaCl₂, gélatine et albumine bovine sont indispensables, et à ces concentrations.

3- Les Globules rouges

Les hématies de poussin nouveau-né et de pigeon ont été les premières utilisées dans la mise au point de la technique d'I.H.A. Elles restent celles dont on se sert le plus.

A l'Institut Pasteur de Lyon, on utilise les hématies de poussin (tableau n°9) nouveau-né. Le sang est prélevé par ponction cardiaque à la seringue contenant 2 ml de solution d'Alsever. Il faut souvent un grand nombre de poussins pour obtenir une faible quantité de sang. Les globules sont lavés 3 fois dans une solution de DGV. Puis on prépare une suspension d'hématies à 50% dans du DGV. Cette suspension peut être conservée plusieurs jours à 4°C, c'est celle à partir de laquelle seront préparées les suspensions utilisées dans la réaction.

La solution d'Alsever a la composition suivante :

Glucose anhydre	20,5 g
Citrate de sodium	8 g
Chlorure de sodium	4,2 g
Acide citrique à rajouter jusqu'à pH 6,1	
Eau distillée	Q.S.P 1000 ml

De nombreuses variétés d'hématies ont été testées depuis la mise au point de la méthode. Ainsi Nathalie J. SCHMIDT et coll. ont comparé en 1971 vingt espèces différentes de G.R. (tableau n° 8 (261)).

Ils ont titré avec les différentes hématies une hémagglutinine spécifique, puis un sérum de lapin immunisé contre la rubéole. Ils signalent que des résultats analogues ont été obtenus avec des sérums humains. Les hématies de cheval, de chèvre, de boeuf, de cobaye, de carpe sont inefficaces. Par contre toutes les autres variétés d'hématies sont efficaces, en particulier les globules rouges O humains.

Les auteurs insistent sur le fait que dans quinze variétés pour lesquelles les résultats sont satisfaisants, certaines ne donnent de bons résultats qu'avec certains types de tampon.

TABLE 1 : Species of erythrocytes agglutinable by rubella virus in HEPES buffer :
specific inhibition of hemagglutination (HA) by rubella immune serum

Species of erythrocyte	Concn of erythrocytes (%)	Diluent	HA titer of rubella antigen	Inhibition of HA by		
:	:	:	:	Preimmune rabbit sérum	Rubella immune	rabbit sérum
Pigeon	0.25	HSAGa	1,024b	< 8	:	128
Chicken, 1-day-old	0.25	HSAG	512	< 8	:	64
Chicken, adult	0.25	HSAG	256	< 8	:	64
Goose	0.08	HSAG	128	< 8	:	32
Turkey	0.28	HSAG	128	< 8	:	32
Human groupe O	0.30	HSAG	256	< 8	:	64
Monkey, rhesus	0.28	HSAG	64	< 8	:	128
Sheep	0.28	HSAG	128	< 8	:	128
Swine	0.28	Modified HEPESc	64	< 8	:	32
Horse	0.28	HSAG	< 4	:	:	:
Goat	0.28	HSAG	< 4	:	:	:
Bovine	0.28	HSAG	< 4	:	:	:
Dog	0.28	HSAG	32	< 16	:	256
Cat	0.28	HSAG	512	< 8	:	128
Rabbit	0.36	HSAG, pH 7,6	128	< 8	:	512
Rat	0.36	HSAG	256	< 8	:	32
Hamster	0.36	HSAG	512	< 8	:	32
Mouse	0.28	Modified HEPESd	128	< 8	:	64
Guinea pig	0.30	HSAG	< 2	:	:	:
Fish (carp)	0.28	HSAG	< 4	:	:	:

a HEPES-saline-albumin-gelatin diluent described by Liebhaver (3) : 0.025 M HEPES, 0.14 M NaCl, 10-2M CaCl2, 1% bovine serum albumin, and 0.00025% gelatin, pH 6,2.

b Reciprocal of titer

c HEPES(0.025 M), 0.14M NaCl, 10-3M CaCl2, 0.03% bovine serum albumin, and 0.03% gelatin pH 6,2.

d HSAG without bovine albumin and gelatin, but with 0.5% heparin-MnCl2-treated fetal bovine serum.

B) La préparation des sérums : l'adsorption

Les sérums humains contiennent des inhibiteurs non spécifiques et des agglutinines non spécifiques vis à vis des érythrocytes aviaires utilisés. Il faut donc traiter les sérums pour éliminer ces facteurs non spécifiques, avant d'aborder la réaction d'I.H.A.

1- Les agglutinines non spécifiques

L'élimination de ces agglutinines se fait par adsorption en mettant en contact le sérum à titrer avec un excès de globules rouges à hémagglutiner. Lorsqu'on utilise des globules rouges de poussins pour la réaction d'IHA, on peut remplacer ceux-ci par des globules rouges de poulet. La réalisation pratique de la technique est alors plus facile.

2- Les inhibiteurs non spécifiques

Les inhibiteurs non spécifiques font essentiellement partie de la classe des bétalipoprotéines ou lipoprotéines de faible poids moléculaire. Cependant, HAUKENES (132 bis) a montré récemment que des inhibiteurs non spécifiques se trouvaient parfois dans les lipoprotéines de haut poids moléculaire et de très faible poids moléculaire. Trois techniques peuvent être utilisées en routine pour adsorber les inhibiteurs non spécifiques.

a) Technique utilisant le kaolin (45)(126)

Le kaolin était déjà utilisé comme adsorbant dans la sérologie des arbovirus. C'est un adsorbant non sélectif des protéines sériques. Certains lui reprochent son manque de spécificité. Outre l'adsorption des inhibiteurs non spécifiques, il adsorberait une partie des immunoglobulines.

b) Technique utilisant le mélange Héparine-
Chlorure de Manganèse (77)

Le mélange chlorure de manganèse-héparine précipite spécifiquement les bétalipoprotéines. C'est dire les critiques que l'on peut porter à cette méthode qui parfois n'enlève pas tous les inhibiteurs non spécifiques.

c) Technique utilisant le mélange sulfate de
Dextran-Chlorure de Calcium (169)

Le sulfate de Dextran et le CaCl_2 précipitent toutes les classes de lipoprotéines. L'intérêt de cette technique est donc grand. Cependant, les concentrations en sulfate de Dextran pour que l'adsorption soit complète, sont élevées. Il est nécessaire pour obtenir une agglutination correcte d'enlever l'excès de sulfate de Dextran.

Comme on le voit, aucune de ces trois techniques n'est vraiment satisfaisante. HAUKENES (132 bis) a montré qu'il pouvait exister des sérums déclarés faussement positifs après avoir été traités par l'une ou l'autre de ces techniques, mais surtout lorsque l'on utilise le mélange héparine- MnCl_2 .

C) Description de la technique utilisée à l'Institut
Pasteur de LYON

Réactifs : tampons alcalin pH 9 et tampon acide
Hémagglutinine-Sérum à tester, globules rouges de poussins.
Adsorption par le kaolin.

1- Le traitement des sérums : l'adsorption (tableau n°10)

- Adsorption des inhibiteurs non spécifiques

Dans un tube à essai on met :

- . 0,4 ml de tampon pH 9 sans albumine bovine
- . 0,1 ml de sérum à titrer
- . 0,5 ml de suspension de Kaolin
(suspension à 0,25% dans le tampon pH 9 sans albumine bovine)

On laisse vingt minutes à la température ambiante en agitant le tube de temps en temps.

On centrifuge pendant dix minutes à 2000 tours minutes.

- Adsorption des hémagglutinines non spécifiques

Dans les sérums traités on ajoute 0,1 ml de G.R. de poulet en suspension à 50% dans du DGV.

On agite sans remettre le kaolin en suspension

On laisse 1 heure à 4°C, puis on centrifuge à 2000 tours/mn pendant dix minutes.

Enfin on décante le surnageant qui est considéré comme la dilution au 1/10 du sérum à étudier.

2- Le titrage de l'antigène (tableau n° 11)

On dispose d'une plaque à cupules (système Micro-titer) 8X12 cupules.

On met successivement :

- . 0,05 ml de tampon alcalin pH 9 dans les cupules des 3 premières rangées de 12
- . 0,05 ml d'antigène dans la première cupule des 3 rangées (antigène reconstitué à partir de l'antigène lyophilisé du commerce par adjonction d'eau distillée).

Dans ces premières cupules, l'antigène est donc dilué au 1/2.

- Par passage successif d'une cupule dans la cupule suivante, sur chacune des trois rangées de 0,05 ml du mélange antigène et tampon pH 9, à l'aide de microdiluteurs ou d'une pipette Eppendorf à 0,05 ml, on réalise des dilutions de l'antigène de 1/2 à 1/4096.
- On rajoute ensuite dans chacune des cupules des trois premières rangées
 - . 0,05 ml de tampon pH 9, pour remplacer la quantité de sérum de la réaction d'IHA.
 - . 0,1 ml de globules de poussins de moins de quatre jours à 0,15% dans le tampon pH 6,2 (tampon pH 9 + tampon acide à parties égales)
- On laisse la plaque 1 heure à 4°C, puis 1/2 heure à la température ambiante. La lecture peut alors se faire.

La dernière dilution qui donne une hémagglutination complète est considérée comme l'unité hémagglutinante.

Dans une cupule témoin, on vérifie la qualité des hématies en mettant en contact 0,1 ml de tampon pH 9 et 0,1 ml de globules rouges de poussin, dont la sédimentation doit être parfaite.

3- La réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) (tableau n°12)

a) La réaction elle-même

Elle s'effectue sur des plaques à cupules Microtiter (8 X 12 cupules). On dispose de sérums à titrer, adsorbés en dilution 1/10.

- On met 0,05 ml de tampon pH 9 dans toutes les cupules d'une rangée de 8, sauf dans la deuxième.

- On met 0,05 ml de sérum à titrer dans les 1ère et 2ème et 3ème cupules d'une rangée de 8. Ainsi le sérum est dilué au 1/10 dans la 2ème cupule et au 1/20ème dans la 3ème cupule.
- A partir de cette 3ème cupule, par passage successif d'une cupule dans la suivante de 0,05 ml du mélange sérum à titrer tampon pH 9, on réalise des dilutions du sérum de 1/20 à 1/640, à l'aide de microdiluteurs ou d'une pipette Eppendorf de 0,05 ml.
- On ajoute alors dans toutes les cupules de la rangée de 8, sauf dans la première, 0,05 ml d'antigène dilué qui a été préalablement titré. On réalise une dilution dans le tampon alcalin de cet antigène de façon à ce que cette dilution représente une valeur antigénique de 4 unités hémagglutinantes que l'on engage dans la réaction d'IHA.
- On mélange en agitant la plaque avec précaution et on laisse le contact antigène-anticorps se faire pendant 1 heure 30 à température ambiante.
- On ajoute alors 0,1 ml de G.R. de poussins à 0,15% en tampon à pH 6,2 dans toutes les cupules.
- Au bout d'une heure à 4°C puis une demi-heure à la température ambiante la lecture peut alors se faire. La dernière dilution pour laquelle il n'y a pas d'hémagglutination représente le titre du sérum à tester.

b) Les contrôles à réaliser :

- Le témoin sérum

Dans la première cupule, il n'y a en présence que le sérum à titrer, le tampon et les globules rouges. Il ne doit pas y avoir d'hémagglutination dans cette cupule, ce qui signifierait que l'adsorption des agglutinines non spécifiques a été insuffisante et rendrait toute interprétation du titre du sérum aléatoire.

- le contrôle de l'adsorption (Témoin Sindbis)

On utilise un antigène hémagglutinant de type voisin de celui de la rubéole mais contre lequel la population française ne possède pas normalement d'anticorps : l'antigène Sindbis (Arbovirus) d'après Cl. HANNOUN. On réalise un titrage du sérum dans les mêmes conditions que précédemment. Il ne doit pas y avoir d'inhibition de l'hémagglutination dans la rangée de l'antigène de contrôle, ce qui traduirait la présence d'inhibiteurs non spécifiques.

- le sérum témoin positif et le sérum témoin négatif.

Un sérum témoin positif et le sérum témoin négatif seront chaque fois titrés.

- le contrôle du titrage de l'antigène

On met en présence dans quatre cupules, des dilutions différentes de l'antigène (1ère cupule : dilution 4 unités hémagglutinantes, 2ème cupule : 2 unités hémagglutinantes, 3ème cupule : 1 unité hémagglutinante, 4ème cupule : 1/2 unité hémagglutinante) avec les globules rouges de poussin. L'agglutination doit être forte dans les 1ère et 2ème cupules (4+) subtotale dans la 3ème cupule (3+), faible dans la dernière cupule (+).

III - LES PROBLEMES TECHNIQUES DE LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

Ces problèmes ne remettent pas en cause la place primordiale qu'occupe la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, tant dans le diagnostic de la rubéole acquise et congénitale, que dans le contrôle de l'immunité rubéolique.

Cette réaction présente de nombreux avantages qu'il faut garder à l'esprit avant de la critiquer :

- . La spécificité
- . La sensibilité (les titres d'anticorps sont en moyenne cinq à dix fois plus élevés que dans la réaction de séroneutralisation)
- . La fidélité
- . La reproductibilité
- . La rapidité (les résultats peuvent être donnés en 24 à 48 heures)
- . La possibilité d'utiliser un antigène non infectieux en traitant l'hémagglutinine au Tween Ether.

Ceci dit, il existe cependant quelques problèmes techniques qui restent à résoudre.

Nous avons parlé de la fidélité de la réaction dans les avantages. Celle-ci n'est pas absolue puisque il existe quelques faux résultats positifs. En effet le problème de l'adsorption des inhibiteurs non spécifiques n'est pas résolu entièrement. Trois techniques d'adsorption sont utilisables (kaolin, héparine, $MnCl_2$, sulfate de Dextran- $CaCl_2$). Il semble cependant qu'actuellement, la technique utilisant le kaolin soit encore la plus sûre (132 bis).

La standardisation des réactifs n'est pas réalisée. Ce qui empêche la comparaison des titres d'un laboratoire à l'autre. D'autant plus que la standardisation des érythrocytes à hémagglutiner n'existe pas. Les globules rouges de poussin sont parmi les plus utilisés mais :

- Le prélèvement doit se faire sur des poussins de moins de 4 jours. C'est dire déjà les difficultés d'approvisionnement surtout pour des laboratoires de faible importance.

- La technique de prélèvement reste peu prisée des techniciens.

- Il existe deux périodes de l'année, au printemps et à l'automne, pendant lesquelles le sang des poussins se conserve mal. Il faut alors réaliser plusieurs prélèvements par semaine.

- Enfin, le coût de ces prélèvements est relativement élevé.

C'est pour ces raisons que nous avons étudié deux techniques utilisant des globules rouges O+ trypsinés humains, l'une utilisant le kaolin comme adsorbant et un double tampon alcalin et acide, l'autre utilisant l'héparine-MnCl₂ comme adsorbant et le tampon HSAG.

PREPARATION DES GLOBULES ROUGES

: Globules rouges de poussiens de moins de 4 jours	: Hématies humaines O+ trypsinées
: - Prélèvement du sang de poussin par ponction intracardiaque avec une seringue contenant du liquide d'Alsever.	: - Prélèvement du sang humain O+ à partir d'un flacon fourni par le Centre de Transfusion sanguine.
: - Lavage des globules rouges de poussin dans du D.G.V	: - Lavage des hématies humaines en Hanks
: - Stockage des G.R. de poussin à 50% dans du D.G.V 4 jours maximum de conservation.	: - Stockage des hématies humaines en Hanks à 50% - Conservation 10 j. env.
: - Nouveau lavage	: - Nouveau lavage
: - Trypsination du culot d'hématies 20 mn de bain marie - 1 volume de culot pour 3 volumes de trypsine	: - Trypsination du culot d'hématies 20 mn de bain marie - 1 volume de culot pour 3 volumes de trypsine
: - Nouveau lavage	: - Nouveau lavage
: - Suspension d'hématies trypsinées en Hanks à 10% - Conservation 4 j. env.	: - Suspension d'hématies trypsinées en Hanks à 10% - Conservation 4 j. env.
: - Avant la réaction suspension à 0,15% (à partir de la solution à 50% en DGV)	: - 30 mn avant la réaction suspension à 0,15% à partir de la solution à 10%
: En tampon pH 6,2 { 1/2 tampon pH 9	: Soit en tampon { soit en tampon pH6,2
: 1/2 tampon acide	: 1/2 tampon pH 9
	: HSAG
	: 1/2 tampon acide

Tableau n° 10

TRAITEMENT DES SERUMS

Elimination des inhibiteurs non spécifiques et des agglutinines spontanées

Technique INSTITUT PASTEUR	Hématies O+	Technique N°1	Hématies O+	Technique n° 2
G.R. poussin - Kaolin, tampon pH9 et tampon acide		trypsinées, Héparine MnCl ₂ , HSAG		trypsinées, Kaolin , tampon pH 9 et acide
O,4 ml de tampon pH 9	O,2 ml de tampon HSAG		O,4 ml de tampon pH 9	
O,1 ml de sérum à titrer	O,1 ml de sérum		O,1 ml de sérum à titrer	
O,5 ml de suspension de Kaolin	O,05 ml d'héparine à 5000 U/ml		O,5 ml de suspension de Kaolin	
	O,05 ml de MnCl ₂			
- 20mn à température ordinaire	- 20mn à température ordinaire		- 20mn à température ordinaire	
- centrifugation 10 mn à 2000t/mn	- centrifugation 10mn à 2000t/mn		- centrifugation 10 mn à 2000t/mn	
- 0,1ml de suspension à 50% dans du DGV de globules rouges de poule	- 0,1ml de suspension à 50% en Hanks de globules rouges O+ humains		- 0,1ml de suspension à 50% en Hanks de globules rouges O+ humains	
- 1 heure à 4°C	- 1 heure à 4°C		- 1 heure à 4°C	
- centrifugation 10 mn à 2000t/mn	- centrifugation 15mn à 2500t/mn		- centrifugation 15 mn à 2500t/mn	
- On décante le surnageant considéré comme la dilution au 1/10 du sérum	- A O,2ml du surnageant on ajoute 0,3ml de tampon HSAG on obtient un sérum dilué au 1/10		- On décante le surnageant considéré comme la dilution au 1/10 du sérum	

Tableau n° 11

TITRAGE DE L'ANTIGENE

Technique INSTITUT PASTEUR	Technique n° 1	Technique n° 2
G.R. poussin Kaolin, tampon pH9 et tampon acide	Hématies O+ trypsinées, Héparine MnCl2, HSAG	Hématies O+ trypsinées, Kaolin, tampon pH 9 et acide
0,05 ml de tampon alcalin	0,05 ml de tampon HSAG	0,05 ml de tampon alcalin
0,05 ml d'antigène	0,05 ml d'antigène	0,05 ml d'antigène
Dilutions de cupule en cupule à l'aide d'une pipette Eppendorf	Dilutions de cupule en cupule à l'aide d'une pipette Eppendorf	Dilutions de cupule en cupule à l'aide d'une pipette Eppendorf
0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
- 0,05 ml de tampon pH 9	- 0,05 ml de tampon HSAG	- 0,05 ml de tampon pH 9
- 0,1 ml de globules rouges de poussins de moins de 4 jours à 0,15% dans le tampon comprenant	- 0,1 ml d'hématies O+ trypsinées à 0,15% dans du HSAG	- 0,1 ml d'hématies O+ trypsinées à 0,15% dans un tampon comprenant
1/2 tampon pH 9		1/2 tampon pH 9
1/2 tampon acide		1/2 tampon acide
1 heure à 4°C	1 heure à 4°C	1 heure à 4°C
1/2 heure à température ambiante	2 heures à température ambiante	2 heures à température ambiante
lecture	lecture	lecture

REACTION D'INHIBITION DE L'HÉMATAGGLUTINATION

Technique INSTITUT PASTEUR	Technique n° 1	Technique n° 2
G.R. poussin, Kaolin, tampon pH 9 et tampon acide	Hématies O+ trypsinées, Héparine MnCl ₂ , HSAG	Hématies O+ trypsinées, Kaolin, tampon pH 9 et acide
0,05 ml de tampon pH 9	0,05 ml de tampon HSAG	0,05 ml de tampon pH 9
0,05 ml de sérum	0,05 ml de sérum	0,05 ml de sérum
- Dilution de cupule en cupule à l'aide d'une pipette Eppendorf : 0,05 ml	- Dilution de cupule en cupule à l'aide d'une pipette Eppendorf : 0,05 ml	- Dilution de cupule en cupule à l'aide d'une pipette Eppendorf : 0,05 ml
- 0,05 ml d'antigène dilué sous 4 unités hémagglutinantes en tampon pH 9	- 0,05 ml d'antigène dilué sous 4 unités hémagglutinantes en tampon HSAG	- 0,05 ml d'antigène dilué sous 4 unités hémagglutinantes en tampon pH 9
- 1 Heure 30 à température ambiante	- 1 heure à 4°C	- 1 heure 30 à température ambiante
- 0,1 ml de globules de poussin à 0,15% en tampon pH 6,2 (1/2 tampon pH 9	- 0,1ml de G.R. O+ trypsiné à 0,15% en tampon HSAG	- 0,1ml de G.R O+ trypsiné à 0,15% en tampon pH 6,2
1/2 tampon acide		1/2 tampon pH 9
		1/2 tampon acide
- 1 heure à 4°C	1h30 à 4°C	- 1 h à 4°C
1/2h à température ambiante lecture	2h à température ambiante lecture	2h à température ambiante lecture

CHAPITRE III

ETUDE COMPARATIVE DE DEUX TECHNIQUES UTILISANT DES GLOBULES
ROUGES HUMAINS O+ TRYPSINES AVEC UNE TECHNIQUE DE REFERENCE
UTILISEE A L'INSTITUT PASTEUR DE LYON

I - PRESENTATION DES TECHNIQUES

(pour le résumé des modalités pratiques des techniques
voir les tableaux 9, 10, 11, 12)

A) La technique de référence

C'est celle de l'Institut Pasteur de Lyon. Les réactions sont effectuées sur plaques à cupules MICROTITER, les dilutions se font à la pipette EPPENDORF. L'antigène utilisé est celui fourni par les laboratoires BOEHRING. Les tampons de la réaction sont les tampons alcalin pH 9 et acide, préparés à l'Institut Pasteur et dont nous avons détaillé les formules dans le chapitre précédent. Les globules rouges de poussins de moins de quatre jours sont recueillis sur liquide d'Alsever et mis en suspension ensuite dans le tampon DGV. L'exécution de la réaction a été décrite précédemment. Pendant la durée de notre travail, deux laborantines se sont succédées dans la pratique de la technique de référence.

B) Technique utilisant des globules rouges humains O+ trypsinés, héparine-MnCl₂, et le tampon HSAG (technique n°1)

C'est à la suite des travaux de BIDDLE (F.) (31), de QUIRIN (E.P.) (224) et coll. aux U.S.A. et de DALLE (M.), BAJOLLE (F.) et CROIX (J.C.) en France (81) que nous avons entrepris de titrer 496 sérums par la technique que nous allons décrire et de comparer les résultats à la technique de référence. Les plaques de lecture, la pipette à dilution, l'antigène utilisés sont les mêmes que dans la technique de référence.

1- Le tampon HS AG

C'est le tampon utilisé pour diluer l'hémagglutinine, préparer la suspension de travail des globules rouges, diluer les sérums lors de la réaction d'IHA.

La formule du tampon a été donnée au chapitre précédent. Nous avons utilisé pour la moitié environ des sérums titrés par cette méthode, du tampon préparé par nous-même : A partir d'une solution mère, contenant HEPES, NaCl et CaCl, stérilisée par filtration et conservée à +4°C, nous avons préparé notre tampon selon les besoins journaliers en rajoutant la gélatine et l'albumine bovine. Lorsque nous n'avons pas pris ces précautions de préparation en deux temps, la conservation du tampon a été médiocre. Pour l'autre moitié des sérums à titrer nous avons utilisé le tampon HSAG présenté par les laboratoires FLOW en flacon de 100 ml. La conservation à 4°C du flacon ouvert est satisfaisante pendant quinze jours. Le pH était toujours plus élevé que ne doit l'être le pH optimal de la réaction et nous devions le ramener à 6,2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique normal sous contrôle du pHmètre.

2- L'Héparine

Nous avons utilisé quatre sortes d'héparine du commerce différentes : Héparine Choay, Héparine Roche, Héparine Fournier, Héparine Flow. Toutes étaient présentées en flacons titrant 5000 U/ml. Il ne nous a pas semblé observer de différence de résultat en fonction de l'héparine utilisée. Nous avons toujours conservé l'héparine à 4°C.

3- Chlorure de Manganèse -MnCl₂

Pendant une partie de notre expérimentation nous avons utilisé une solution molaire que nous avons préparée nous-même. Puis nous nous sommes servi de la solution molaire commerciale présentée par les laboratoires FLOW. nous avons toujours conservé la solution MnCl₂ à 4°C.

4- Les globules rouges humains O+ (tableau n° 9)

Nous avons utilisé des globules rouges fournis par le centre de transfusion sanguine de Lyon en flacons de 125 ml dans la solution apyrogène suivante :

- citrate trisodique 2 H ₂ O	2, 58	g
- acide citrique 1 H ₂ O	0,32	g
- phosphate monosodique 2 H ₂ O	0,247	g
- glucose anhydre	2,32	g
- eau distillée	q.s.p.	10 ml

La date limite d'utilisation pour les transfusions était presque toujours dépassée de 24 à 48 heures lorsque nous avons commencé à utiliser ces hématies. C'est peut-être la raison pour laquelle, après avoir lavé trois fois les hématies en liquide de Hanks et stockées celles-ci à 50% dans le même milieu nous n'avons jamais pu obtenir une conservation supérieure à 10 Jours à 4°C. Ceci contrairement à DALLE et coll. (81) et QUIRIN et coll. (224) qui obtiennent des conservations de 3 à 4 semaines.

La solution de Hanks couramment utilisée en virologie a la composition suivante :

- solution A : NaCl	100g
KCl	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,5 g
eau distillée q.s.p. ...	500 ml
- solution B : Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,75 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g
eau distillée q.s.p.	500 ml

- solution C : CaCl_2 anhydre 1,75 g
eau distillée q.s.p. 200 ml
- solution D : glucose anhydre 20 g
eau distillée q.s.p. 100 ml
- solution E : NaHCO_3 1,4 g
eau distillée q.s.p. 100 ml

1 litre de solution de Hanks contient :

sol. A	40 ml
sol. B	40 ml
sol. C	20 ml
sol. D	5 ml
sol/ E	20 ml
eau distillée q.s.p.	1000ml

5- La trypsination des globules rouges (tableau n° 9)

La solution de trypsine utilisée a la composition suivante :

Trypsine	2,5 g
NaCl	7 g
KCl	0,4 g
NaH_2PO_4 Anhydre	0,15 g
Glucose	1 g
NaHCO_3	2,2 g
Rouge de Phénol	10 mg
Eau distillée	1000 ml

Son pH est de 7,8 à 8. Sa stérilisation se fait par filtration ; la conservation est bonne à -20°C.

A partir d'une partie des globules rouges conservés en Hanks à 50%, après centrifugation et prélèvement du culot, celui-ci est mis en suspension dans la solution de trypsine à raison de 1 volume de culot pour 3 volumes de trypsine et placé au bain-marie à 37°C pendant 20 minutes. Ensuite on supprime l'excédent de trypsine par deux lavages en Hanks, et on réalise une suspension finale de globules rouges en Hanks à 10%. Cette suspension se conserve environ trois à quatre jours. Elle peut être utilisée tant qu'on ne décèle ~~pa~~ aucune hémolyse.

6 - La suspension de travail (tableau n° 9)

Elle est réalisée à partir de la solution de globules rouges en Hanks à 10%. La dilution doit être réalisée moins de 30 minutes avant son utilisation. Nous avons essayé plusieurs suspensions de travail : à 0,25%, à 0,20%, à 0,15%. Il nous semble que c'est cette dernière dilution dans le tampon HSAG qui permet la meilleure lecture.

7- Le traitement des sérums (tableau n° 10)

Chaque sérum est préparé de la manière suivante :
Dans un tube à essai on met successivement :

- 0,1 ml de sérum
- 0,2 ml de tampon HSAG
- 0,05 ml d'héparine titrée à 5000 U/ml

Puis après agitation

- 0,05 ml de $MnCl_2$ en solution molaire.

On a alors l'apparition d'un précipité blanchâtre.
On laisse le mélange 20 minutes à température ordinaire et on centrifuge 10 minutes à 2000 tours:minute. On rajoute 0,1 ml de suspension à 50% en Hanks, de globules rouges humains O+.

Les sérums ainsi traités sont alors laissés 1 heure à 4°C puis centrifugés 15 minutes à 2500 tours:minute. On prélève très facilement 0,2 ml du surnageant (le précipité étant alors très adhérent au fond du tube) auquel on ajoute 0,3 ml de tampon HSAG. On obtient ainsi un sérum dilué au 1/10 théoriquement dépourvu d'inhibiteurs non spécifiques et prêt pour la réaction d'IHA.

8- Le titrage de l'antigène (tableau n° 11)

Il est réalisé comme nous l'avons mentionné au chapitre précédent dans la description de la technique utilisée à l'Institut Pasteur de Lyon. Il présente comme particularité : l'emploi d'un seul tampon, le tampon HSAG et celui d'hématies humaines O+ trypsinées. La lecture enfin ne peut se faire qu'au bout de deux heures.

9- La réaction d'inhibition de l'hémagglutination (tableau n° 12)

Elle est réalisée comme nous l'avons mentionné au chapitre précédent avec les particularités suivantes :

On utilise le seul tampon HSAG et des hématies humaines O+ trypsinées. Le contact antigène-anticorps est maintenu 1 heure à 4°C avant l'addition de la suspension de travail de globules rouges humains. Ceci parce que, à température ambiante, le pH 6,2 du tampon HSAG ne permet pas une stabilité de l'antigène supérieure à 1 heure (168).

Après agitation, les plaques sont remises 1 heure 30 à 4°C puis placées sur une paillasse réfrigérée. La lecture ne peut se faire qu'au bout de deux heures. Elle reste excellente au bout de 12 heures.

Nous avons utilisé systématiquement les contrôles suivants :

- Le témoin sérum de chacun des sérum à titrer (sérum au 1/10 avec tampon HSAG et G.R.O.+ trypsinés), un témoin sérum positif, un témoin sérum négatif, un témoin hémagglutinine.

La bonne élimination des inhibiteurs non spécifiques a été vérifiée chaque fois que les résultats étaient discordants par rapport à la technique de référence. Pour cela, nous avons utilisé l'antigène de contrôle Sindbis.

Enfin, lorsque les résultats donnaient un titre supérieur ou égal à 640, nous avons repris le titrage des sérums en prolongeant la dilution jusqu'à 5120.

- C) Technique utilisant des globules rouges humains O+ trypsinés, kaolin, et les tampons alcalin pH 9 et acide de la technique de référence technique n° 2 (tableau n° 9, 10, 11, 12)

Nous sommes partis de l'idée qu'il était peut-être possible de réaliser la technique de référence en remplaçant simplement les globules rouges de poussin par les globules rouges O+ humains trypsinés. Nous avons titré ainsi 520 sérums.

La préparation d'une solution de globules rouges O+ trypsinés à 10% en Hanks est la même que dans la technique précédente. La suspension de travail est toujours à 0,15% dans un mélange à partie égale de tampon alcalin pH 9 et de tampon acide. La réalisation pratique de cette technique est la même que celle de la technique de référence mais la lecture des plaques ne doit se faire qu'au bout de deux heures. Les résultats sont toujours satisfaisants au bout de 12 Heures.

D) Technique utilisée pour rechercher les IgM spécifiques

Nous n'avons pu faire cette recherche malheureusement que sur un seul sérum.

1- La technique de référence de l'Institut Pasteur de Lyon est la suivante :

L'adsorption est réalisée par héparine-MnCl₂ de la manière suivante :

- à 0,4 ml de sérum on ajoute 0,2ml de MnCl₂
(en sol. molaire) et 0,2ml d'héparine (à 750 U/ml)
- On laisse 20 minutes à 4°C
- On ajoute 0,1 ml de globules rouges de poulet à 50% dans du D.G.V.
- On laisse 1/2 heure à 4°C
- On centrifuge 10 mn à 2600 t:mn
- On récupère le surnageant.

C'est sur ce dernier représentant le sérum dilué au 1/2 et théoriquement débarrassé des inhibiteurs et agglutinines non spécifiques que va se faire la séparation des IgG-IgM.

Cette opération est réalisée par gel-filtration sur colonne de Sephadex G200. Cette technique de séparation des IgG et des IgM nécessite un sérum peu dilué, ce qui interdit l'usage du kaolin qui donne d'emblée un sérum dilué au 1/10. L'échantillon de sérum préalablement traité par le mélange héparine-chlorure de Manganèse est appliqué à la surface d'une colonne de Sephadex (R) G 200 (K 15/90) équilibré en tampon Tris-acide-chlorhydrique-chlorure de sodium à pH 8. L'élution est réalisée à l'aide du même tampon à un débit de 2ml:heure. Des fractions de 2ml sont collectées, sur lesquelles les IgM et les IgG sont spécifiquement dosées par immuno-néphélométrie (J. SIRE et coll. non publié). La réaction d'IHA est alors réalisée sur chaque fraction en contrôlant soigneusement l'éventuelle présence d'inhibiteurs non spécifiques résiduels à l'aide d'antigène ²indbis.

2- Application des techniques n° 1 et n° 2 à
la recherche des IgM spécifiques

L'adsorption est réalisée comme décrit ci-dessus. Enfin la réaction de l'inhibition de l'hémagglutination sur les tubes recueillis dans les fractions IgM et IgG est réalisée comme elle est décrite dans la technique n° 1 et la technique n° 2

II - RESULTATS

A) Les titrages de l'antigène

Nous avons essayé de voir si la trypsination des globules rouges O+ humains se justifiait. Nous avons réalisé trois titrages d'antigène en tampon HSAG en utilisant d'une part des globules rouges O+ trypsinés, d'autre part, des globules rouges O+ non trypsinés (tableau n°13). Avec les globules rouges O+ trypsinés, le titre de l'antigène est 2 à 4 fois supérieur. Nous avons réalisé 4 titrages d'antigène en tampon alcalin pH 9 et tampon acide, en utilisant la même méthode de comparaison (tableau n°14). Le titrage de l'antigène ne dépasse jamais 1/8 lorsqu'on utilise des globules rouges O+ non trypsinés.

Nous avons réalisé 13 titrages d'antigène en utilisant la technique n°1 (globules rouges O+ trypsinés, tampons HSAG). Nous avons comparé dans le tableau n° 15 les résultats obtenus ainsi avec ceux obtenus en utilisant la technique de référence (G.R. de poussin, tampon alcalin pH 9 et tampon acide). Les titres obtenus avec la technique n° 1 ont toujours été supérieurs à ceux obtenus avec la technique de référence sauf une fois où ils étaient égaux. Huit fois les résultats étaient supérieurs d'une dilution, deux fois supérieurs d'une dilution et demi et deux fois il y avait deux dilutions d'écart. Il n'y a jamais eu de problème de lecture. La technique n°1 donne un gain de sensibilité et permet une économie d'antigène non négligeable.

TABLEAU N° 13

TITRAGE DE L'ANTIGENE EN TAMPON HSAG

Technique utilisant des globules rouges O+ humains <u>non</u> trypsinés	:	Technique utilisant des globules rouges O+ humains trypsinés	:
1/64	:	1/256	:
1/32	:	1/512	:
1/128	:	1/1024	:

TABLEAU N° 14

TITRAGE DE L'ANTIGENE EN TAMPON ALCALIN pH9 et
TAMPON ACIDE

Technique utilisant des globules rouges O+ humains <u>non</u> trypsinés	:	Technique utilisant des globules rouges O+ humains trypsinés	:
1/8	:	1/192	:
1/2	:	1/128	:
1/2	:	1/192	:
1/8	:	1/256	:

TABLEAU N° 15

TITRAGE DE L'ANTIGENE

COMPARAISON DE LA TECHNIQUE N° 1 ET DE LA

TECHNIQUE DE REFERENCE

Technique n° 1	:	Technique de référence	:
G.R. humains O+ trypsinés	:	G.R. de poussin Tampon alcalin	:
Tampon HSAG	:	pH9 et tampon acide	:
1/768	:	1/256	:
1/128	:	1/64	:
1/512	:	1/256	:
1/128	:	1/128	:
1/128	:	1/64	:
1/128	:	1/64	:
1/256	:	1/64	:
1/192	:	1/128	:
1/256	:	1/128	:
1/512	:	1/256	:
1/512	:	1/256	:
1/1024	:	1/256	:
1/512	:	1/128	:

Nous avons réalisé 10 titrages d'antigène en utilisant la technique n° 2 (globules rouges humains O+ trypsinés, tampon alcalin pH 9 et tampon acide). Nous avons comparé dans le tableau n° 16, les résultats obtenus en utilisant la technique de référence (globules rouges de poussin, même tampon). Les titres obtenus avec la technique n° 2 sont sensiblement identiques à ceux obtenus avec la technique de référence. Six fois les titres étaient identiques, trois fois les titres étaient inférieurs d'une ou d'une demi-dilution, enfin une fois le titre était supérieur d'une dilution. Il n'y a jamais eu de problème de lecture.

B) La réaction d'inhibition de l'héماغglutination

1- Comparaison des résultats obtenus par la technique n°1 avec ceux obtenus par la technique de référence.

Le tableau n° 17 montre la répartition des 496 sérums en fonction de leurs titres dans l'une ou l'autre des techniques. La représentation graphique de ces données, beaucoup plus parlante, est donnée dans le schéma n° 18. On peut voir que les résultats obtenus par les deux techniques sont pour la plupart concordants à une dilution près. Le tableau n° 19 donne les pourcentages correspondants. Dans la première colonne sont inscrits les titres obtenus par la technique de référence. Dans la deuxième colonne sont inscrits les pourcentages de sérums titrés par la technique n° 1, qui s'éloignent du titre obtenu par la technique de référence de deux dilutions en dessous. Dans la troisième colonne sont inscrits les pourcentages des titres s'éloignant d'une seule dilution en dessous. Dans la quatrième colonne sont inscrits

TABLEAU N° 16.

TITRAGE DE L'ANTIGENE

COMPARAISON DE LA TECHNIQUE N° 2 ET DE
LA TECHNIQUE DE REFERENCE

Technique n° 2 G.R. humains O+ trypsinés , tampon alcalin pH 9 et tampon acide	Technique de référence G.R. de poussin -Tampon alca- lin pH 9 et tampon acide
1/32	1/48
1/64	1/64
1/256	1/256
1/128	1/128
1/192	1/128
1/256	1/256
1/128	1/256
1/192	1/192
1/256	1/256
1/128	1/192

Tableau n° 17

TITRES OBTENUS AVEC : Héparine, MnCl ₂ , 0 + trypsinés, HSA G												
TITRES OBTENUS AVEC : Kaolin, G.R. de poussin, pH 9 et tampon acide												
	< 10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	TOTAL
< 10	55	3										58
10		6	8	1								15
20		1	3	11	9							24
40			5	9	26	11	2					53
80				9	41	31	13	3				97
160					11	35	35	11				92
320						5	28	24	8			65
640						2	2	25	25	4		58
1280								3	10	14		27
2560									1	4	2	7
5120												
TOTAL	55	10	16	30	87	84	80	66	44	22	2	496

Représentation graphique de la répartition des titres
 en comparant la technique n°2 (héparine, $MnCl_2$,
 tampon HSAG, G.R. O+) à la technique de référence.

Graphique n° 18

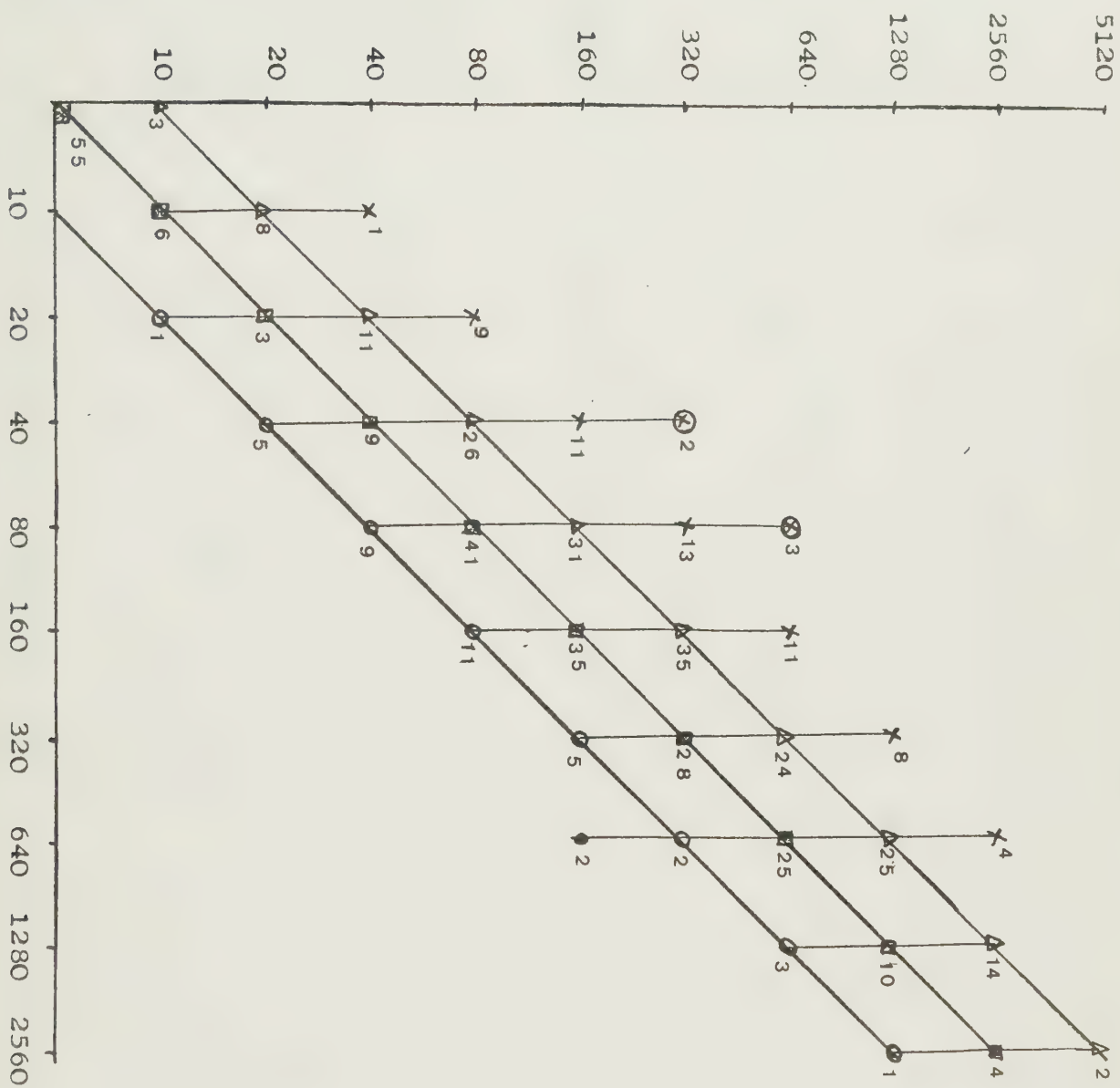


Tableau n° 19

res obtenus :	TITRES OBTENUS AVEC : HEPARINE - MnCl2					
ec : Kaolin :	HSAG, GLOBULES ROUGES O+ TRYPSINES					
Tampon :						
9 et acide :	2 dil.en	1 dil.en	même	1 dil.en	2 dil.en	3 dil.en
R. poussin :	dessous	dessous	dilution	dessus	dessus	dessus
	en %	en %		en %	en %	en %
< 10 :	0	0	94,8	5,2	0	0
10 :	0	0	40	53,3	6,7	0
20 :	0	4,2	12,5	45,8	37,5	0
40 :	0	9,4	17	49	21	3,6
80 :	0	9,3	42,3	31,9	13,4	3,1
160 :	0	12	38	38	12	0
320 :	0	7,7	43,1	36,9	12,3	0
640 :	3,45	3,45	43,1	43,1	6,9	0
1280 :	0	11,1	37	51,9	0	0
2560 :	0	14,3	57,1	28,6	0	0
Moyenne :	0,3	7	42,5	38,5	11	0,7

les pourcentages des titres identiques. Enfin dans les cinquième, sixième et septième colonnes sont inscrits les pourcentages des titres qui s'éloignent respectivement d'une, de deux et de trois dilutions en dessus. Il est possible de tirer une valeur moyenne pour chacune des colonnes :

- 0,3 % des sérums ont un titre inférieur de deux dilutions
- 7 % des sérums ont un titre inférieur d'une dilution
- 42,5% des sérums ont un titre égal
- 38,5% des sérums ont un titre supérieur d'une dilution
- 11% des sérums ont un titre supérieur de deux dilutions
- 0,7% des sérums ont un titre supérieur de trois dilutions

2- Comparaison des résultats obtenus par la technique n° 2 avec ceux obtenus par la technique de référence.

Nous avons procédé de la même façon que dans le paragraphe précédent pour comparer les résultats obtenus à partir de 520 sérums. Les tableaux n° 20, 21, 22, objectivent les résultats. Ils correspondent aux tableaux 18, 19, 20 du paragraphe précédent. Les résultats sont les suivants :

- 0,3 % des sérums ont un titre inférieur de deux dilutions.
- 11 % des sérums ont un titre inférieur d'une dilution
- 54,3 % des sérums ont un titre égal
- 31,4 % des sérums ont un titre supérieur d'une dilution
- 3 % des sérums ont un titre supérieur de deux dilutions.

C) Comparaison des techniques n°1 et n° 2 appliquées à la recherche d'IgM spécifiques et de la technique de référence.

Le graphique n° 23 représente le résultat de la séparation des IgM et des IgG par la technique de gel fil-

Tableau n° 20

TITRES OBTENUS AVEC : Kaolin, G.R. 0 + trypsinés, tampons pH 9 et acide													
TITRES OBTENUS AVEC : Kaolin, G.R. de poussin, tampons pH 9 et acide		< 10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	TOTAL
< 10	62	1											63
10	1	12	13										26
20		2	12	8									22
40		1	8	21	21	3							54
80			1	5	33	32	9						80
160					3	50	54	13					120
320						13	33	39	1				86
640							6	24					41
1280								2	13	7			22
2560									2	4			6
5120													
TOTAL	63	16	34	34	57	98	102	78	27	11			520

Représentation graphique de la répartition des titres
 en comparant la technique n°2 (Kaolin, tampon pH9 et
 acide, G.R O+) à la technique de référence.

Graphique n° 21

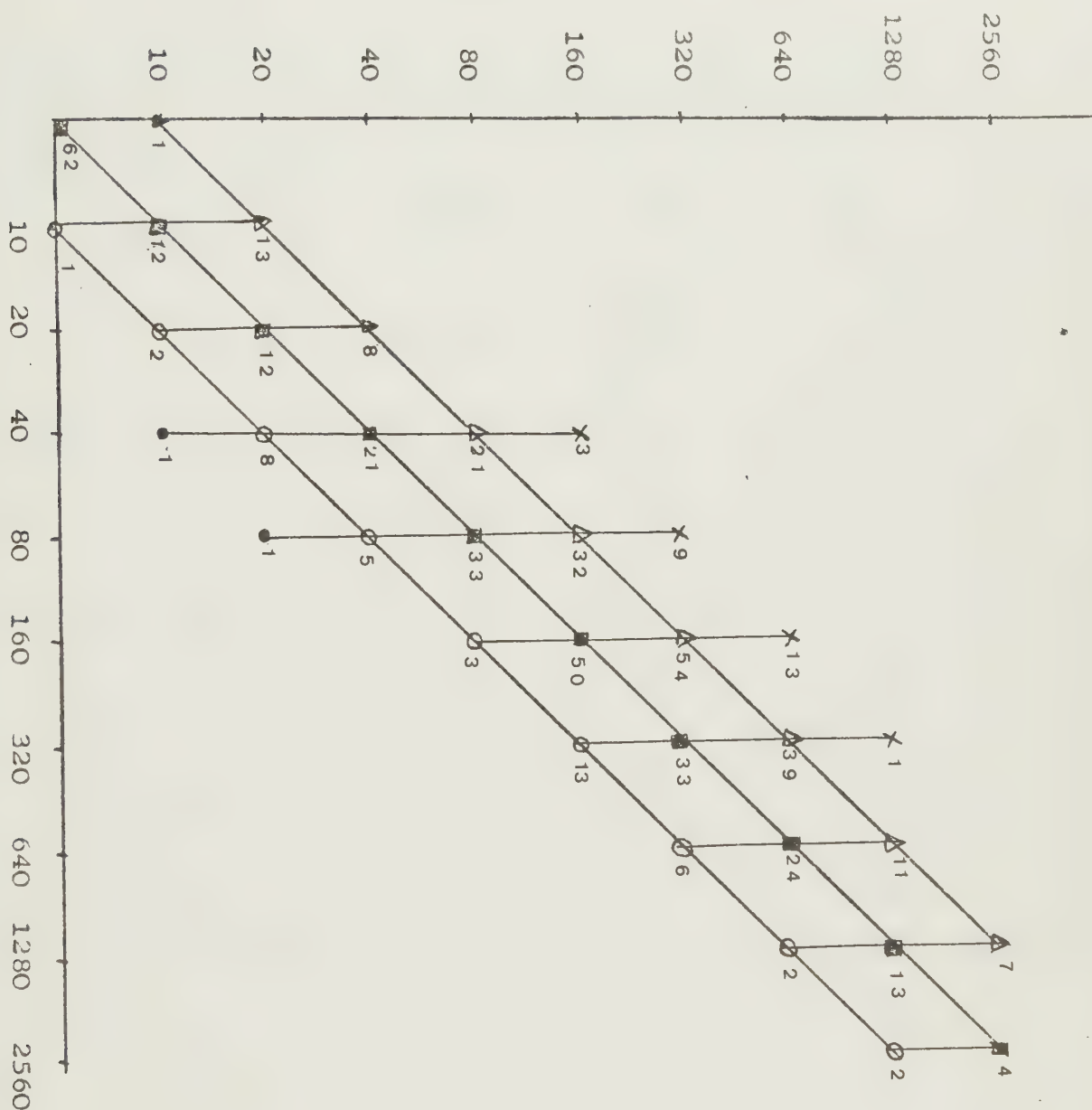


Tableau n° 22

Echantillons obtenus avec : Kaolin Tampon PH 9 et acide R poussin	TITRES OBTENUS AVEC : KAOLIN, G.R O+ TRYPSINES, TAMPON PH9 ET ACIDE				
	2 dil. en dessous	1 dil.en dessous	même dilution	1 dil. en dessus	2 dil. en dessus
< 10	0	0	98,4	0,16	0
10	0	3,85	46,15	50	0
20	0	9,1	54,5	36,4	0
40	1,85	14,80	38,9	38,9	5,55
80	1,25	6,25	41,25	40,25	11,25
160	0	2,5	41,7	45	10,8
320	0	15,1	38,4	45,35	1,15
640	0	14,6	58,6	26,8	0
1280	0	9,1	59,1	31,8	0
2560	0	33,35	66,65	0	0
Moyenne	0,3	11	54,3	31,4	3

tration sur colonne de Sephadex. La courbe est le reflet de la densité optique (correspondant à la quantité de protéines) dans les différents tubes recueillis. Le numéro des tubes figure en abscisse, la densité optique en ordonnée. Les IgM se trouvent du tube 18 au tube 28 avec un maximum dans le tube 24. Les IgG se trouvent du tube 28 au tube 40 avec un maximum dans le tube 34.

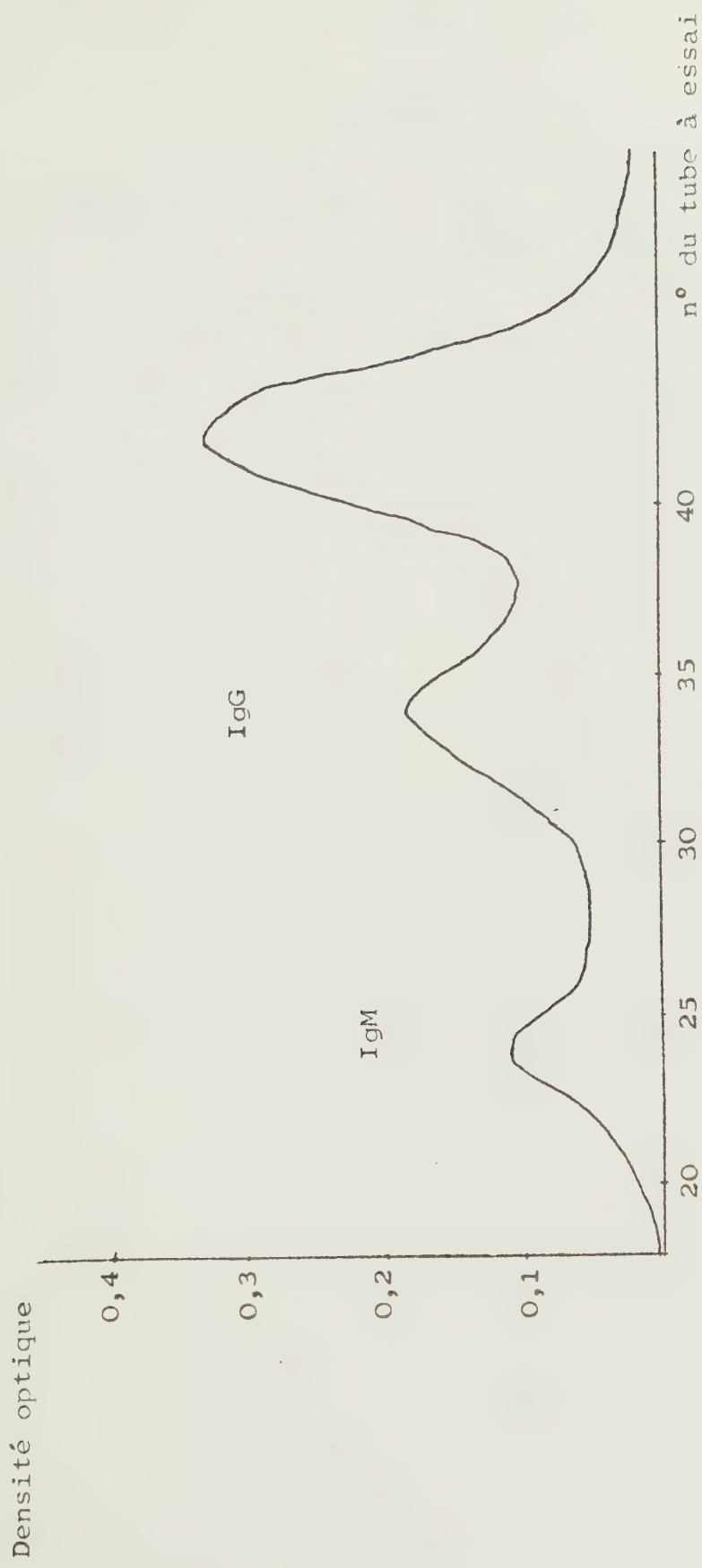
Le tableau n° 24 donne les résultats de la réaction d'I.H.A. recherchée dans les tubes 18 à 40 et permet de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus pour le même sérum quelques mois auparavant par la technique de référence, et qui avaient été corroborés par la séparation en gradient de saccharose.

D) Un essai d'amélioration du temps de conservation des hématies O+ trypsinées par le formol.

Comme nous avons des problèmes de conservation des hématies en Hanks à 50% (hémolyse au bout de 10 jours environ) nous avons essayé de formoler les globules rouges humains O+ trypsinés. Nous avons utilisé la solution citratée formolée suivante :

. Citrate de Na	8	g
. Formol à 37%	53,2	ml
. Eau physiologique	800	ml

Nous avons formolé les G.R. lorsqu'ils étaient en Hanks à 50% à raison d'une partie de la solution citratée formolée pour 50 parties de la solution de G.R. en Hanks à 50%. La trypsination a été réalisée ensuite comme décrit précédemment. C'est la solution de G.R. formolés et trypsinés à 10% en Hanks que nous avons conservée. Nous avons réalisé deux titrages d'antigène à partir de cette solution ; l'un



Séparation des IgM et des IgG par la technique de gel filtration sur colonne de Sephadex.

TABLEAU N° 24

RECHERCHE D'IGM

Technique de référence G.R. Poussin Kaolin		Technique N°1 O+ Héparine MnCl2		Technique n°2 O+ Kaolin	
7 :	0	18 :	0	:	0
8 :	0	19 :	0	:	0
9 :	++	20 :	++	:	++
0 :	+++	21 :	++++	:	+++++
1 :	+++	22 :	+++++	:	++++++
2 :	+++	23 :	++++++	:	+++++++
3 :	+++	24 :	++++++	:	++++++
4 :	+++	25 :	+++++	:	++++++
5 :	+++	26 :	+++++	:	+++++
6 :	++	27 :	++++	:	++++
7 :	++	28 :	+++++	:	+++
8 :	++	29 :	+++	:	+++
9 :	++	30 :	+++++	:	+++++
0 :	++	31 :	+++	:	++++
1 :	++	32 :	++++	:	++++
2 :	++	33 :	++++	:	++++
3 :	++	34 :	++++	:	+++++
4 :	++	35 :	+++++	:	+++++
5 :	++	36 :	++++	:	++++
6 :	++	37 :	+++	:	+++
7 :	++	38 :	++	:	++
8 :	+	39 :	+	:	+
9 :	+	40 :	0	:	0
0 :	+	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:

au bout d'une semaine de conservation, l'autre au bout de trois semaines. Le tampon utilisé était le tampon alcalin pH 9 et le tampon acide. Nous avons comparé les résultats avec un titrage d'antigène réalisé dans les mêmes conditions, mais avec des globules rouges humains O+ trypsinés le jour même (tableau n° 25). Les titrages sont identiques. Il ne semble pas que le fait de formoler des hématies trypsinées modifie la sensibilité des réactions. Nous avons réalisé quelques titrages de sérum par ce moyen. Les résultats étaient semblables que les hématies trypsinées soient formolées ou non (ceci en tampon alcalin pH 9 et tampon acide).

III - DISCUSSION

- A) A propos des résultats obtenus lors de la réaction d'I.H.A. par la technique n° 1 (Héparine, $MnCl_2$, G.R. O+ trypsinés, H.S.A.G).

Il faut insister sur le fait que 88% des résultats obtenus avec la technique n° 1 concordent à une dilution près avec les résultats obtenus avec la technique de référence. Il existe donc une bonne corrélation entre les deux techniques.

Plus de 50% des titres obtenus lors de l'utilisation de la technique n° 1 sont supérieurs, d'au moins une dilution aux titres obtenus lors de l'application de la technique de référence. Ceci nous semble pouvoir être attribué à un gain de sensibilité qui est surtout marqué pour les titres 20 et 40.

Ces résultats seraient très intéressants si nous n'avions trouvé trois sérums dont les titres étaient inférieurs à 10 lors de l'application de la technique de référence et égaux à 10 lors de l'utilisation de la technique n° 1. Les titres obtenus avec l'antigène Sindbis étaient alors également de 10. Tous les inhibiteurs de l'hémagglutination n'avaient donc pas été adsorbés.

TABLEAU N° 25

TITRAGE DE L'ANTIGENE EN TAMPON ALCALIN pH9 ET
TAMPON ACIDE

: : Technique utilisant des globules : rouges humains O+ trypsinés et : formolés :	: : : :	: : Technique utilisant des : globules rouges humains : O+ trypsinés :	: : : :
: : 1/256 :	: : :	: : 1/256 :	: : :
: : 1/128 :	: : :	: : 1/128 :	: : :

Enfin la lecture des plaques est souvent difficile. Ceci nous semble dû à l'usage de l'héparine dans l'adsorption. La mauvaise sédimentation des globules rouges peut, à notre avis, être due au résidu d'héparine dans les sérums au moment de la réaction d'I.H.A..

Ces inconvénients de la technique n° 1 nous font préférer la technique n° 2.

B) A propos des résultats obtenus lors de la
réaction d'I.H.A. par la technique n° 2

(Kaolin, G.R.O+ trypsinés, tampon pH 9 et acide).

Il faut également insister sur le fait que 96% des résultats obtenus lors de l'application de la technique n°2 concordent à une dilution près avec les résultats obtenus avec la technique de référence. D'autre part 34% des résultats obtenus sont supérieurs d'au moins une dilution alors que seulement 11% des résultats obtenus sont inférieurs d'au moins une dilution. Il existe donc une bonne corrélation entre les deux techniques avec un gain de sensibilité pour la technique n° 2.

Nous avons eu pour un sérum un titre égal à 10 lors de l'utilisation de la technique n° 2 alors que le titre de ce sérum était inférieur à 10 lors de l'application de la technique de référence. Le titre recherché avec l'antigène Sindbis est resté négatif lors de l'application des deux techniques. Cet exemple semble confirmer le gain de sensibilité.

Enfin nous n'avons jamais eu de problèmes de lecture des plaques avec cette technique qui nous a donné entière satisfaction.

C) A propos des résultats obtenus en utilisant les techniques n°1 et n°2 dans la recherche d'IgM spécifiques.

Nous ne pouvons présenter malheureusement qu'un seul cas. Nous n'avons eu aucune difficulté dans la réalisation pratique des techniques n°1 et n°2. Les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus avec la technique de référence.

D) A propos de l'utilisation des globules rouges O+ trypsinés.

Les résultats ont montré que leur usage ne posait pas de problème particulier dans la réaction d'I.H.A. et qu'ils apportaient un gain de sensibilité.

Il existe un problème de conservation des hématies trypsinées, mais celui-ci n'est pas ~~pl~~as important que celui posé par la conservation des globules rouges de ~~pu~~ussin. Les quantités de sang nécessaire pour réaliser les réactions sont mineures : 2 ml de sang O+ permettent de réaliser 1000 réactions d'I.H.A. Il est dès lors possible d'imaginer que les prélèvements soient réalisés à partir d'un seul donneur ou de quelques donneurs connus ; les prélèvements étant effectués une fois par mois, puisque le conditionnement actuel du sang permet son usage pendant une telle période.

Ceci permettrait de standardiser les résultats de la réaction d'I.H.A. du moins en ce qui concerne les laboratoires dépendant d'un même centre de transfusion.

Deux problèmes peuvent se poser que nous n'avons pas étudiés sur le plan expérimental. Le premier, c'est le titrage d'un sérum d'une personne O Rh- immunisée contre les hématies O Rh+. Dans ce cas, QUIRIN E.P. et coll. (224) préconisent l'emploi de sang O Rh- pour réaliser le titrage du sérum. Le second problème est posé par le titrage de sérum ayant un titre élevé en agglutinines froides. DALLE et coll. (81) ont montré qu'il n'y avait pas d'agglutination envers les hématies O+ trypsinées utilisées dans la réaction.

Par quel processus le traitement par la trypsine rend-il l'hématie agglutinable ? Il est probable d'après BIDDLE (31) que l'action de cette protéase aboutit à un décapage superficiel de l'environnement protéique de l'hématie, qui conduit au démasquage des récepteurs. La nature exacte de ces récepteurs ou l'implication dans ces structures de certains composants comme les sucres aminés (N-acetyl-glucosamine) n'ont pu être précisées.

Il nous a paru possible de supprimer le temps d'adsorption des hémagglutinines non spécifiques, du fait de l'utilisation de globules rouges humains. Le gain de temps réalisé est loin d'être négligeable. Il compense le fait que la lecture des plaques doit être réalisée après un délai plus long que lors de l'utilisation de globules rouges de poussin (2 heures au lieu de 1/2 heure).

CONCLUSION

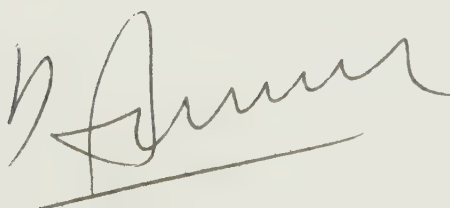
L'objet de cette thèse est d'essayer de montrer que l'emploi des hématies humaines O+ trypsinées remplace avantageusement l'emploi de globules rouges aviaires dans la réaction d'inhibition de l'héماغglutination (I.H.A.). Nous avons tenté de rechercher quelle était la meilleure technique possible pour réaliser cette réaction d'I.H.A.

Dans un premier chapitre nous avons fait de brefs rappels généraux sur la maladie rubéole. Ceci nous a permis de montrer que le diagnostic d'une rubéole tant acquise que congénitale ne peut être effectué qu'avec l'aide de la réaction d'I.H.A. et que cette réaction est la seule actuellement utilisable lorsqu'on veut déterminer l'état immunitaire systématique d'une large partie de la population.

Dans un deuxième chapitre nous avons étudié les différentes modalités pratiques de la réalisation de la réaction d'I.H.A. Nous pensons que les variations qui existent d'un laboratoire à l'autre résident dans le choix des globules rouges à agglutiner, dans celui des adsorbants nécessaires pour le traitement des sérums à examiner, enfin dans la qualité du tampon. Nous avons décrit la technique utilisée à l'Institut Pasteur de Lyon et qui comporte l'utilisation de globules rouges de poussins de moins de 4 jours, l'adsorption des sérums par le kaolin, l'utilisation de deux tampons, l'un alcalin de pH9,

Vu, à LYON, le

Le Président de la Thèse :



l'autre acide. A partir des quelques difficultés rencontrées dans la réalisation de cette technique, nous avons essayé de mettre en évidence l'intérêt que peut avoir une technique utilisant des globules rouges humains.

Dans le troisième chapitre, nous décrivons nos expériences et les résultats qui en découlent. Nous avons titré 496 sérums par une technique comportant l'utilisation d'hématies humaines O+ trypsinées, l'adsorption des sérums par héparine et Chlorure de Manganèse et le tampon Hepes-Saline-Albumine-Gelatin (HSAG), puis nous avons titré 520 sérums par une technique comportant l'utilisation d'hématies humaines O+ trypsinées, mais une adsorption des sérums par le kaolin et l'utilisation de deux tampons, l'un alcalin de pH9, l'autre acide. Pour chacune de ces deux techniques, nous avons comparé les résultats à une technique de référence : celle utilisée à l'Institut Pasteur de LYON. Nous avons écarté la technique comportant l'adsorption des sérums par héparine et $MnCl_2$, en raison des mauvaises qualités de lecture, et surtout des risques de faux positifs, du fait de l'adsorption des inhibiteurs non spécifiques qui peut sembler parfois incomplète. Nous avons retenu la deuxième technique étudiée, pour ses qualités de sécurité et la facilité de lecture des résultats. L'introduction d'hématies humaines O+ trypsinées dans la réaction d'I.H.A. présente les avantages suivants :

Vu, à LYON, le

Le Président de la Thèse :

A handwritten signature in dark ink, consisting of a stylized 'Y' followed by a series of loops and a horizontal line at the bottom.

CONCLUSIONS

- Elle apporte parfois un gain de sensibilité.
- Elle résout les problèmes d'approvisionnement en globules rouges de poussins de moins de 4 jours.
- Elle permet la suppression d'un des temps de l'adsorption ; celui concernant les agglutinines non spécifiques.
- Elle est utilisable sans aucun problème lors de la recherche d'immunoglobulines spécifiques.

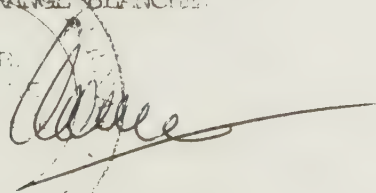
Le Président de la Thèse :
(nom et signature)



VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LYON, le 12 07 1973

Vu, le Directeur de l'U.E.R.
GRANDE-BLANCHE.



B. SALLE

Le Président de l'Université Claude Bernard
Président du Comité de Coordination
des Etudes Médicales,



D. GERMAIN

B I B L I O G R A P H I E

REFERENCES GENERALES

- 1 - Séminaire sur l'épidémiologie et la prévention de la rougeole et de la rubéole. Centre International de l'Enfance. Paris, juin 1964.
Arch. Ges. Virus f. 1965. 16. 393. 534.
- 2 - Symposium sur la standardisation des vaccins contre la rougeole et la sérologie de la rubéole. Association Internationale des Sociétés de Microbiologie, Lyon, juin 1964.
Institut Mérieux Edit.
- 3 - Numéro spécial sur la rubéole.
Amer. J. Dis. Child. Oct. 65. 110. N°4 345. 476.
- 4 - Table ronde sur les cellules diploïdes humaines.
Lyon. 25-26 avril 1968. Fond. Mérieux. 17, bd des Belges Lyon.
- 5 - International Symposium on rubella vaccines. Association Internationale des sociétés de microbiologie.
Londres, Novembre 68. Karger, édit, 1969.
- 6 - Proceedings of the international conference on rubella immunization. Bethesda. février 1969.
Amer. J. Dis. Child. Juillet, août 1969. 118 N°1-2.
- 7 - Compte rendu de la table ronde sur la prophylaxie de la rubéole. Centre International de l'Enfance. Paris. Juin 71.
- 8 - Colloque sur le fractionnement des IgM et IgG dans la rubéole. Jeudi 2. 5. 1974. Institut Pasteur Paris.

- 1 - ACHS (R), HARPER (R.G.) and SIEGEL (M.)
Unusual dermatoglyphic findings associated with rubella embryopathy.
New Engl. J. Med. 1966. 274. 148-150.
- 2 - ABRUTYN (E), HERRMANN (KL), KARCHMER (A.W), FRIEDMAN (J.P.),
POGE (E), WITTE (J.J.)
Rubella vaccine comparative study.
Amer. J. Dis. Child. 1970. 120. 129-133.
- 3 - AJJAN (N), BADILLET (M), FRIBOURG-BLANC (A), MANDE (R),
MAROTEAUX (P).
Un vaccin et l'amour d'autrui.
C M 1971 93, 4. 489-502.
- 5 - ALFORD (C.A.), NEVA (F.A) and WELLER (T.H)
Virologie and sérologie studies on human products of conception
after maternal rubella.
New England J. Med. 1964. 271. 1275-1281.
- 6 - ALFORD (C.A)
Studies on antibody in congenital rubella infection
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110. 455-463.
- 7 - ALFORD (C.A)
The immunologic status of the new-born
Hosp. Pract. 1970. 5. 88-94.
- 8 - AMSTEY (M.S)
Intra amniotic inoculation of rubella virus
Amer. J. Obstetr. Gyn. 1969. 104. 573-577.
- 9 - ANSART (P)
La suppression des inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination de la rubéole. Etude comparative de trois méthodes.
Thèse Médecine, Bordeaux 1971.
- 10 - AULETTA (A.E), GITNICK (G.L), WHITMIRE (G.E.) and SEVER (J.L)
An improved diluent for rubella hémagglutination and hémagglutination inhibition tests.
Appl. Microbiol. 1968. 16. 691-694.
- 11 - BADILLET (M) et HERZOG (F)
Essai de prévention des embryopathies rubéoliques par les gammaglobulines plasmatiques humains standards chez les femmes enceintes particulièrement exposées (2428 dossiers)
Arch. Ges. Virus Forschung 1965. 16. 1-5. 509-512.

- 12 - BADILLET (M) et HERZOG (F)
Gammaglobulines et rubéole.
Presse Med. 1967. 75, 16. 799-802.
- 13 - BADILLET (M)
Gammaglobulines et rubéole.
Rev. Med. Tours, 1968, 11. 253-258.
- 14 - BADILLET (M), HERZOG (F), et SOULIER (J.P)
La rubéole : données cliniques, épidémiologiques et biologiques
recueillies en 6 années d'observation.
Sem. Hop. Paris 1969. 45, 28. 1967-1980.
- 15 - BANATVALA (J.E), HORST MANN (D.M), PAYNE (M.C) and GLUCK (L)
Rubella syndrome and thrombocytopenic purpura in new-born
infants : clinical and virologic observatories.
New. England J. Med. 1965. 273. 474-478.
- 16 - BANATVALA (J.E) et coll.
A serological method for demonstrating recent infection
by rubella.
Brit. Med. J. 1970. 1. 237-238.
- 17 - BANATVALA (J.E)
Rubella as a disease
Amer. J. Dis. Child. 1969. 118. 66.
- 18 - BANATVALA (J.E) et coll.
Laboratory diagnosis of rubella
Brit. Med. J. 1970. 1. 237-238.
- 19 - BANATVALA (J.E) et coll.
Serological assessment of rubella during pregnancy
Brit. Med. J. 1970. 1. 247-250.
- 20 - BASTIN (R), LAPRESLE (C), LAFAIX (C)
Acquisitions recentes sur la rubéole.
Rev. Prat. 1966. 16. 1107-1110.
- 21 - BASTIN (R)
Diagnostic clinique et biologique de la rubéole.
Rev. Prat. 1971. 21, 5. 707-714.
- 22 - BAUBLI (J.V) and BROWN (G.C)
Specific reponse of the immunoglobulines to rubella infection.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1968. 128. 206-210.

- 23 - BAYER (W.L), SHERMAN (F.E), MICHAELIS (R.H), SZETO (I.L.F)
and LEWIS (J.H).
Purpura in congenital and acquired rubella
New England J. Med. 1965. 273. 1362-1366.
- 24 - BEALE (J.A), CHRISTOFINIS (G.C) and FURMINGER (I.G)
Rabbits cells susceptible to rubella virus
Lancet 1963. 2, 640-641.
- 25 - BEGUERY (J)
Complications de la rubéole
Thèse Bordeaux 1968.
- 26 - BELLANTI (J.A), ARTENSTEIN (M.S), OLSON, EL BUESHER, LURS (C.E),
MILSTEAD (K.C).
Congenital rubella.
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110. 464-472.
- 27 - BENTEGEAT (J.)
La détermination du risque rubéoleux chez la femme enceinte.
Prophylaxie actuelle et perspectives d'avenir.
Rev. Franc. Gyn. 1970. 65. 12-22.
- 28 - BEST (J) and coll.
Serological tests for rubella.
Lancet 1969. 2. 546.
- 29 - BIANCONE (S)
Cardiovascular abnormalities attributable to maternal virosis
during pregnancy.
Minerva Cardioangiol. 1969. 17. 46-50.
- 30 - BIANCONE (S)
Maternal rubella after the first trimester.
Brit. Med. J. 1969. 4, 122-123.
- 31 - BIDDLE (F)
The unmasking of receptors for rubella virus by trypsinization of red cells.
Microbiol. 1971. 3. 255-260.
- 32 - BLANCHER (G)
Le diagnostic de la rubéole. Indications de la vaccination.
Feuillets du Prat. 1969. 34. 643-645.
- 33 - BORDES (M), KERNEN (J), BANDLER (D), LARRIBAUD (J).
Epidémiologie et prophylaxie de la rubéole.
L'Hôpital. 1969. 653-659.

- 34 - BORTON (T) and coll.
Audiological findings in hearing loss secondary to
maternal rubella.
Pediatrics 1970. 45. 225-229.
- 35 - BOUE (A), PLOTKIN (S.A), BOUE (J.G)
Action inhibitrice du virus de la rubéole sur la multiplication
de différentes cellules embryonnaires humaines cultivées
in vitro.
C.R Acad. Sci. Paris, 1964. 259. 489-491.
- 36 - BOUE (A), PLOTKIN (S.A)
Etablissement de souches cellulaires embryonnaires diploïdes
humaines chroniquement infectées par le virus de la rubéole.
C.R. Acad. Sci. Paris 1964. 259. 255-257.
- 37 - BOUE (A)
Action du virus de la rubéole sur les cellules embryonnaires
humaines in vitro.
Rev. Fr. et Cli. Bio. 1966. 11, 6. 569-577.
- 38 - BOUE (J.G) et BOUE (A)
Aspects génétiques des défauts du développement embryonnaire et
viroses.
Press. Med. 1966. 74, 27. 1397-1402.
- 39 - BOUE (A), HANNOUN (C), BOUE (J.G) et PLOTKIN (S.A)
Cytological, virological and chromosomal studies of cell
strains from aborted human fetuses.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966. 122, 1. 11-16.
- 40 - BOUE (A)
Les viroses prénatales, la rubéole congénitale.
Revue du Prat. 1966. 16, 17. 2311-2316.
- 41 - BOUE (A)
Applications du serodiagnostic de la rubéole.
Rev. Pediat. 1967. 3. 143-151.
- 42 - BOUE (A)
La rubéole congénitale. Biologie, pathogénie, prophylaxie.
Arch. Franc. Ped. 1967. 24. 333-350.
- 43 - BOUE (A)
Sérodiagnostic de la rubéole.
Bul. Acad. Nat. Med. Paris 1967. 151. 266-270.

- 44 - BOUE (A) et DESHAYES (E)
Technique indirecte de séroneutralisation du virus de la
rubéole sur cellules diploïdes humaines.
Path. Biol. 1967. 15. 324-328.
- 45 - BOUE (A), NICOLAS (A) et LANG (R)
La technique d'inhibition de l'hémagglutination du virus
de la rubéole.
Applications Pratiques.
Ann. Inst. Pasteur. 1968. 114. 317-330.
- 46 - BOUE (A), CELERS (J)
Vaccination contre la rubéole. Essais cliniques avec la
souche de virus atténué HPV77.
Presse Médicale 1968. 76. 299.
- 47 - BOUE (A)
Vaccination contre la rubéole.
G.M.F. 1969. 76, 30. 6103-6108.
- 48 - BOUE (A)
Vaccins et vaccinations contre la rubéole.
Path. Biol. Août. Sept. 1969. 17. 777-785.
- 49 - BOUE (A)
Réinfections rubéoliques.
Presse Med. 1970. 78, 36. 1591-1594.
- 50 - BOUE (A)
Problèmes pratiques du diagnostic de la rubéole par les
examens de laboratoire.
Rev. Med. 1971. 22. 1367-1374.
- 51 - BOUE (A)
Rubéole
E.M.C. Inf. (2) 1971. 8044 A 10. 1-8.
- 52 - BOUE (J.G), BOUE (A) et LAZAR (P).
Altérations chromosomiques indirectes par le virus de la
rubéole et par le virus de la rougeole dans les cultures
diploïdes humaines cultivées in vitro.
Path. et Biol. 1967. 15. 997-1007.

- 53 - BRISOU (B), SEGERAL (J.C), DOUBLET (M).
La réaction d'inhibition de l'hémagglutination dans le diagnostic de la rubéole.
Etude comparée des méthodes utilisant des hématies de poussin en tampon boraté D.G.V. et des hématies de pigeon en tampon de Mikaelis adapté.
Ann. Biol. Clin. 1973. 31. 257.
- 54 - BRODY (J.A), SEVER (J.L) and SCHIFF (G.M)
Prévention of rubella by gammaglobulin during an epidemia in Barrow, Alaska in 1964.
New England J. Med. 1965. 272. 127-129.
- 55 - BRODY (J.A), SEVER (J.L), MAC ALISTER (R), SCHIFF (G.M) et CUTTING (R).
Rubella epidemic in the Pribilofs 1963 1.
Epidemiological, clinical, and serologic findings.
J. Amer. Med. Assoc. 1965. 191. 619-623.
- 56 - BROWN (G.C), MAASSAB (H.F), VERONELLI (J.A) and FRANCIS (T).
Rubella antibodies in human serum : detection by indirect fluorescent antibody technic.
Science 1964 145. 943-945.
- 57 - BROWN (G.C)
Consequences of natural exposure to rubella during pregnancy.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1968. 127. 340.
- 58 - BURGIN-WOLFF (A), HERNANDEZ (R) et JUST (M)
Separation of rubella IgM, IgA and IgG antibodies by gel filtration on agarose.
Lancet 1971. 7737. 1278-1280.
- 59 - BUTLER (N.R), DUDGEON (J.A), MAYES (K), PECKMAN (C.S) and WYHAR (K.C)
Persistence of rubella antibodies with and without embryopathy.
Brit. Med. J. 1965. 2. 1027-1029.
- 60 - CABASSO (V.J) and STEBBINS (M.R)
Study of the spread of rubella virus from inoculated to uninoculated contact cercopithecus monkeys.
J. Lab. Clin. Med. 1965. 65. 612-616.
- 61 - CABASSO (V.J), LOVIC (R.E), HOK (K.A), ROBINSON (C.T), DAVIS (P.C) and MINER (R.C).
Loss of rubella antibody from immune globulin treated with kaolin.
Appl. Microbiol. 1969. 18. 410-415.

- 62 - CANDIOTTI (A)
Surdmutité congénitale consécutive à une maladie infectieuse pendant les trois premiers mois de la grossesse.
Thèse Bordeaux 1949.
- 63 - CANIVET (M), PERIES (J), THOMAS (M), GUILLEMAIN (B).
La technique d'inhibition de l'hémagglutination appliquée au virus de la rubéole. Etude de l'état immunitaire d'une population de femmes enceintes.
Presse Med. 1968. 76, 21. 993-994.
- 64 - CATHALA (F)
Vers la mise au point d'un vaccin vivant atténué contre la rubéole.
Presse Médicale 1966. 74, 53. 2779-2781.
- 65 - CENTER FOR DISEASE CONTROL (C.D.C)
Standard rubella hemagglutination-inhibition test
1970 US Department of Health, Education and Welfare Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta, Ga.
- 66 - CHAGNON (A), and PAVILANIS (V).
Hemagglutination inhibition rubella antibody determination.
Canad. J. Microbiol. 1969. 15. 962-964.
- 67 - CHAGNON (A), SKVORC (R) et PAVILANIS (V)
Réinfection rubéolique : signification chez la femme enceinte.
Un. Med. Can. 1972. 101, 5. 910-915.
- 68 - CHANG (T.W), MOORHEAD (P.S), BOUE (J.G), PLOTKIN (S.A) et HOSKIN (J.M).
Chromosome studies of human cells infected in utero and in vitro with rubella virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1966. 122, 1. 236-243.
- 69 - CHANG (T.W), DESROSIERS (S), WEINSTEIN (L)
Outbreak of rubella in vaccinated population
New-England J. Med. 1970. 283. 246-247.
- 70 - CHIPPAUX-HYPPOLITE (C) et coll.
Recherche des anticorps de la rubéole chez les élèves infirmières. Effets immunologiques des gammaglobulines non spécifiques chez les sujets négatifs.
Rev. Franc. Gyn. 1970. 65, 3. 103-106.
- 71 - CLAMAN (H.N) and al.
Histiocytosis, dysgammaglobulinemia and congenital rubella.
J. Pediatrics 1970. 46. 89.

- 71 bis CLERC (M)
La vaccination contre la rubéole
C.M.L. 1974. 50, 4. 301-307.
- 72 - COOPER (L.Z) and al
Neonatal thrombocytopenic purpura and other manifestations
of rubella contracted in utero.
Amer. J. D. Child. 1965. 110. 416-427.
- 73 - COOPER (L.Z) and al.
Rubella in contacts of infants with rubella associated
anomalies morbidity and mortality.
W.K.L.Y. Rep. 1965. 14. 44.
- 74 - COOPER (L.Z) and KRUGMAN (S).
Diagnosis and management congenital rubella
Pediatrics 1966. 37. 335.
- 75 - COOPER (L.Z)
German measles
Scient. American. 1966. 215. 30. 37 et 130.
- 76 - COOPER (L.Z)
Rubella : A preventable cause of birth defects ; In birth
defects : Original article series, intrauterine infections.
Ed. D. Bergsma. The National Fondation N.Y. 1968. 4. 23-25.
- 77 - COOPER (L.Z), MATTERS (B), ROSENBLUM (J.K), and KRUGMAN (S).
Experience with a modified rubella hemagglutination
inhibition antibody test.
J. Amer. Med. Ass. 1969. 207. 89-93.
- 78 - COOPER (L.Z)
Rubella in pregnancy.
Post grad. Med. 1969. 46. 106-107.
- 78 bis CRADOCK-WATSON (J.E), BOURNE (M.S), VANDERVELDE (E.M)
IgG, IgA, IgM responses in acute rubella determined by
the immunofluorescent technique.
J. Hyg. Camb. 1972. 70. 473.
- 79 - CUSUMANO (C.L), SCHIFF (G.M), SEVER (J.L) and HUEBNER (R.J)
Rubella virus : Nucleic acid studies using 5-iodo-2' deoxy-
uridine.
J. Pediat. 1964. 65. 138-140.

- 80 - DACHY (A), MAMECHE (J), CONTENT (J), BRIHAYE-VANGEER-TRUYDEN(M)
Présentation d'un cas de rubéole congénitale.
J. Pediat. Lyon 1967. 22. 447-457
- 81 - DALLE (M), BAJOLLE (F) et CROIX (J.C)
La réaction d'inhibition de l'hémagglutination dans le
diagnostic de la rubéole.
Apropos de l'étude critique et comparée de 252 sérums traités
par l'héparine-MnCl₂ et mis en réaction avec les hématies
humaines O trypsinées.
Ann. Biol. Cli. 1974. 32. 433-438.
- 82 - DARBOIS (Y), MAURIN (J).
Rubéole et grossesse.
Précisions diagnostiques apportées par la séparation des
Immunoglobulines.
Concours Médical 1972. 94, 7. 1138-1148.
- 83 - DARBOIS (Y) et HERVET (E).
Rubéole et grossesse.
Rev. du Prat. 1975. 25, 4. 297-299.
- 84 - DAVIS (W.J), LARSON (H.E), SIMSARIAN (J.P), PARKMAN (P.D),
MEYER (H.M).
Rubella immunity and résistance to infection.
J.A.M.A. 1971. 215. 600-609.
- 85 - DEBOUT (J.)
Intérêt des sérodiagnostics conjoints de rougeole et de rubéole
dans les éruptions de l'enfant.
Thèse Lille 1970.
- 86 - DEBRE (R), BOUE (A).
Sur la prévention de la rubéole.
Bull. Acad. Nat. Med. Paris 1968. 152. 341-346.
- 87 - DEIBEL (R), COHEN (S.M.), and DUCHARME (C.P)
Sérology of rubella. Virus neutralization, immunofluorescence
in BHK 21 cells and hémagglutination inhibition.
N.Y. State J. Med. 1968, 68. 1355-1362.
- 88 - DOEGE and all.
Studies of rubella and its prévention with immunoglobulin.
J.A.M.A. 1967. 200, 7. 104-110.
- 89 - DOLD (H.J), and NORTHROP (R.L).
The non specific inhibitors of rubella virus hémagglutination.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y) 1969. 128. 577-581.

- 90 - DORE (F)
La rubéole.
La revue de médecine 1968. 459.
- 91 - DRAPPER (C.C) and al.
Hémagglutination-inhibition tests for rubella.
Brit. Med. J. 1969. 1. 177-178.
- 92 - DUDGEON (J.A)
Maternal rubella and its effects on the foetus.
Arch. Dis. Child. 1967. 42. 110-125.
- 93 - DUDGEON (J.A), MARSHALL (W.C), PECKMAN (C.S) and HAWKINKS (G.T)
Clinical and laboratory studies with rubella vaccines in adults.
Brit. Med. J. 1968. 1. 271-276.
- 94 - DUDGEON (J.A), MARSHALL (W.C), PECKHAM (C.S) and HAWKINS (G.T).
Clinical and laboratory studies with rubella vaccine in adults.
Brit. Med. J. 1969. 1. 2716.
- 95 - DUDGEON (J.A), MARSHALL (W.C), and PECKHAM (C.S).
Rubella vaccine trials in adults and children comparison
of three alternated vaccines.
Amer J. Dis. Child. 1969. 118. 237-242.
- 96 - DUMONT (M) et BRUNET (C.L).
Maladies infectieuses et grossesse.
E.M.C Obs. (2). 1969. 039 A10. 1-8.
- 97 - EICHHORN (M.M)
Rubella : will vaccination prevent birth defects.
Science 1971. 173, 3998. 710.
- 98 - ESTELA (L.A)
Rubella virus : direct fluorescence.
Amer. J. Clin. Path. 1967. 47, 2. 129-133.
- 99 - FABIYI (A), SEVER (J.L), RATNER (N), and ACPLAN (B).
Rubella virus, growth characteristics and stability of
infection virus and complement fixing antigen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966. 122, 2. 392-396.
- 100 - FATIGUE (J.P)
La réaction d'inhibition de l'hémagglutination du virus de
la rubéole.
Thèse Toulouse 1968.

- 101 - FELDMAN (H.A)
Removed by héparine $MnCl_2$ of non spécifique rubella
hémagglutinin sérum inhibitor.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y) 1968. 127. 570-573.
- 102 - FIELD (A.M) and al.
A comparaison of the hémagglutination-inhibition test and
the neutralisation test for the detection of rubella
antibody.
Lancet 1967, 2. 182-184.
- 103 - FORREST (J.M) and MENNSER (M.A)
Congenital rubella in school children and adolescents.
Arch. Dis. Child. 1970. 45-63.
- 104 - FOURNIER (A) et MOUTON (Y.J)
Place de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination
dans le sérodiagnostic de la rubéole.
La vie médicale 1971. 7. 727-736.
- 105 - FOURRIER (A) et CAMIER (P)
Acquisitions recentes sur la rubéole congénitale.
Lille Med. 1967. 12. 1072-1078.
- 106 - FRIBOUR-BLANC (A)
Une technique nouvelle : le diagnostic sérologique de la
rubéole et son immunité.
Immex. 1967. 1123-1125.
- 107 - FRIBOURG-BLANC (A)
Quand prescrire et comment interpréter le sérodiagnostic
de la rubéole.
Rev. Med. 1968. 30. 1895-1901.
- 108 - FRIBOURG-BLANC (A)
Intérêt et danger du sérodiagnostic de la rubéole.
C.M. 1972. 94, 35. 5535-5536.
- 109 - FREYMUTH (F) et MOREL (C)
Serologie rubéolique chez la femme enceinte : apport des
méthodes complémentaires de fixation du complément et de
séparation des immunoglobulines par gel-filtration sur
Sephadex G-200
Medecine et mal. infectieuses 1973. 3, 2. 75-80.

- 110 - FROMMEL (D), GERBAL (A), PARIENTE (R) et ROPARTZ (C)
Us et abus des gammaglobulines.
Forum Concours Med. 1971. 93, 22. 4083-4090
- 111 - FROTTIER (J)
La rubéole. Diagnostic clinique et biologique.
Concours Médical 1971. 93, 29. 5175-5180.
- 112 - GENTIL-KOCHER (S)
La rubéole : étude clinique.
G.M.F 1971. 78, 11. 1753-1759.
- 113 - GENTIL-KOCHER (S)
Physio-pathologie de la rubéole.
G.M.F. 1971. 78, 12. 1951-1959.
- 114 - GILLET (F.M)
La vaccination contre la rubéole.
Thèse Lyon. 1970.
- 115 - GILLOT (F), BODIN (G), ALBERT (M) et DECORBERT (G).
A propos d'un cas très probable de rubéole congénitale.
Lyon Méditerranée 1969. 61-70.
- 116 - GILLY (R)
La rubéole congénitale. Bilan des acquisitions récentes.
Rev. Lyon Med. 1968. n° spec. Journées Lyon. de Med. 47.
- 117 - GILLY (R)
La rubéole congénitale. Bilan des acquisitions récentes.
Lyon Med. 1969. 1. 32-35.
- 118 - GIVAN (K.F), ROZEE (K.R), and RHODES (A.J)
Incidence of rubella antibodies in female subjects.
Canad. Med. Ass. J. 1965. 92. 126-128.
- 119 - GODDON (R) et MACABEO (V)
La rubéole.
C.M.L. 1972. 48, 25. 2793-2798.
- 120 - GREEN (R.H), BALSAMO (M.R), GILES (J.P), KRUGMAN (S)
MIRICK (G.S)
Studies on the experimental transmission, clinical course,
epidemiology and prevention of rubella.
Trans. Ass. Amer. Physicians 1964. 77. 118-125.

- 121 - GREEN (R.H), BALSAMO (M.R), GILES (J.P), KRUGMAN (S)
MIRICK (G.S)
Studies of the natural history and prevention of rubella.
Am. J. Dis. Child. 1965. 110. 348.
- 122 - GREGG (N.M)
Congenital cataract following german measles in mother.
Trans. Ophtal. Soc. Aust. 1941, 3, 35-36.
- 123 - GUPTA (J.D), HARLEY (J.D)
Use of formalinized sheep erythrocytes in the rubella
hemagglutination-inhibition test.
Appl. Microbiol. 1970. 20. 843-844.
- 124 - GUPTA (J.D), PETERSON (V.J), STOUT (M) and MURPHY (A.M)
Single-sample diagnosis of recent rubella by fractionation
of antibody on Sephadex G. 200 column.
J. Clin. Path. 1971. 24. 547-550.
- 125 - GUPTA (J.D), PETERSON (V.J), MURPHY (A.M)
Differential immune response to attenuated rubella
virus vaccine.
Infect et Immun. 1972. 5. 2. 151-154.
- 126 - HALONEN (P.E), RYAN (J.M), and STEWART (J.A)
Rubella hemagglutinin prepared with alkaline extraction of
virus grown in suspension culture of BHK 21 cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y) 1967. 125. 162-167.
- 127 - HALSTEAD (S.B), DIWAN (A.R) et ODA (A.I)
Susceptibility to rubella among adolescents and adults
in Hawai.
J.M.A. 1969. 210, 10. 1881-1883.
- 128 - HARDY (J.B), MONIF (G.R), SEVER (J.L) and MEDEARIS (D)
Post natal transmission of rubella virus to nurses
J.A.M.A. 1965. 191. 162.
- 129 - HARDY (J.B) and al.
Adverse foetal outcome following maternal rubella after
the first trimester of pregnancy.
J.A.M.A. 1969. 207. 2414-2420.
- 130 - HARRY (A), FELDMAN.
Removal by heparin-MnCl₂ of non specific rubella hemagglu-
tinin serum inhibitor.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127. 570-573.

- 131 - HASTREITER (A.R), JOORABCHI (B), PUJATTI (G), VAN DER MORST (R.L)
Cardiovascular lesions associated with congenital rubella
J. Ped. (St Louis) 1967. 71. 59-65.
- 132 - HAUKENES (G), AASEN (J).
Rubella hemagglutination inhibitors : their separation from
antibodies.
Acta. Path. microbiol. Scand. Sect. B 79. 1971. 679-685.
- 132 bis HAUKENES (G) et BLOM (H)
False positive rubella virus hemagglutination inhibition
reactions : Occurrence and disclosure.
Med. Microbiol. Immunol. 1975. 161. 99-106.
- 133 - HEGGIE (A.D) and ROBBINS (F.C)
Experimental rubella in rhesus monkeys.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1963. 114. 750-752.
- 134 - HEGGIE (A.D)
Rubella, current concepts in epidemiology and teratology.
Ped. Clin. North. Amer. 1966. 13. 251-266.
- 135 - HERMANN (K.L) and al.
Evaluation of serological techniques for titration of
rubella antibody.
Amer. J. Public Health. 1969. 59. 297-304.
- 136 - HIERHOLZER (J.C) and SUGGS (M.T)
Standardized viral hemagglutination and hemagglutination
inhibition tests.
I. Standardization of erythrocyte suspensions.
Appl. Microbiol. 18. 816-823.
- 137 - HILLARY (I.B), MEENAN (P.N), GRIFFITH (A.H), DRAPER (C.C),
LAURENCE (G.D).
Rubella vaccine trial in children.
Brit. Med. J. 1969. 2. 531.
- 138 - HOLMES (I.H), WARK (M.C), Warburton (M.F)
Is rubella an arbovirus ?
Virology 1969. 37. 15-25.
- 139 - HOLMES (I.H), and Warburton (M.F)
Is rubella an arbovirus ?
Lancet 1967 ii 1233-1236.

- 140 - HORSTMANN (D.M) et al.
Maternal rubella and the rubella syndrome in infants :
epidemiologic clinical and virologic observations.
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110. 408-415.
- 141 - HORSTMANN (D.M)
First trimester exposure to rubella.
J. A. M. A. 1968. 204. 1553-1554.
- 142 - HORSTMANN (D.M), LIEBHABER (H), LEBOUVIER (G.L), ROSENBERG (D.A)
and HALSTEAD.
Rubella reinfections of vaccinated and naturelly immune
persons, exposed in an epidemia.
New. England. J. Med. 1970. 283, 15. 771-778.
- 143 - HUNTLEY (C.C), LYERLY (A.D), PATTERSON (M.V), SEVER (J.L).
Immunoglobulins in infants of rubella exposed mothers.
J. Pediat. 1969. 75. 1186-1193.
- 144 - HUYGELEN (C), PRINZIE (A), PEETERMANS (J), ESMIEU (F)
Le test rubéole.
Bull. Fed. Soc. Gyn. Obst. 1968. 20, 5 bis 445-446.
- 145 - LANJACK and GURZNER (J)
Cellular viraemia in babies infected with rubella virus
before birth.
Brith. Med. J. 1969. 289-292.
- 146 - INGALIS (T.M), BABOTT (F.L), HAMPSON (K.W), GORDON (J.E)
Rubella : its epidemiology and teratology.
Amer. J. Med. Sc. 1960. 239. 363.
- 147 - INGALIS (T.H), PLOTKIN (S.A), MEYER (H.M) et PARKMAN (P.D)
Rubella : epidemiology, virology and immunology.
Amer. J. Med. Sciences 67. 253. 349-373.
- 148 - JAMI (J).
Fréquence de l'immunité contre la rubéole dans une population
féminine adulte de l'agglomération parisienne.
Presse. Med. 1968. 76, 21. 995-996.
- 149 - JAMI (J.)
Contribution à l'étude du risque de rubéole congénitale
dans la région parisienne.
Thèse Paris 1968.

- 150 - JAMMET (M.L)
La rubéole congénitale.
Cercles d'Etudes pediat. 1967. 535.
- 151 - JERESATY (R.M) and RUSSEL (W)
Hepatosplenomegaly and heart disease in the congenital
rubella syndrom.
Pediatrics 1967. 39. 36-42.
- 152 - KATZ (R.G) and al.
Maternal and congenital rubella.
Clin. Pediat. (Phila) 1968. 7. 323-330.
- 153 - KENNY (F.M), MICHAELS (R.H), and DAVIS (K.S)
Rubella encephalopathy.
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110. 374-380.
- 154 - KORONES (S.B) and al.
Congenital rubella syndrom.
J. of Ped. 1965. 67. 166-181.
- 155 - KRESBY (B) and NAUHEIM (J.S)
Rubella retinitis.
Amer. J. Dis. Child. 1967. 113-. 305-310.
- 156 - KRUGMAN (S) and WARD (R)
Infections diseases of children.
The Rubella Chap. n°20. 1968.
- 157 - LAFAIX (C.H)
Vaccination contre la rubéole.
Rev. Prat. 1968. 18, 7. 995-997.
- 158 - LAFER (C.Z), MORRISON (H.N)
Thrombocytopenic purpura progressing to transient hypoplastic
anemia in a newborn with rubella syndrome.
Pediatrics 1966. 38. 499-501.
- 159 - LAMBERT (H.P), STERN (H), WEELSTEED (A.J)
Congenital rubella syndrome.
Lancet 1965. 2. 826-827.
- 160 - LAMY (M) et SEROR (M.E)
La rubéole de la femme enceinte.
Arch. F. Ges. Virusforschung 1965. 16. 377.
- 161 - LAMY (M) et JAMMET (M.L)
La rubéole congénitale
La femme et l'enfant. 1968. 11. 19.

- 162 - LEBON (P.)
L'hémagglutinine du virus de la rubéole. Applications pratiques.
Thèse Paris 1968.
- 163 - LEERHOY (J)
Cytopathic effect of rubella virus in a rabbit cornea cell line.
Science 1965. 633-634. 149.
- 164 - LENNETTE (E.H), WOODIE (J.D) et SCHMIDT (N.J)
A modified indirect immunofluorescent staining technique
for the demonstration of rubella antibodies in human sera.
J. Lab. Clin. Med. 1967. 69, 4. 689-695.
- 165 - LENNETTE (E.H), SCHMIDT (N.J) and MAGOFFIN (R.L)
The hemagglutination test for rubella : a comparaison of
its sensitivity to that of neutralisation, complément
infection and determination of immunity status.
J. Immunol. 1967. 99. 785-793
- 166 - LEPINE(P) et MAURIN (J.)
La rubéole : virus et vaccins.
La femme et l'enfant : 1968. 2. 7.
- 167 - LEPINE (P), ZOURBAS (J.), MAURIN (J.), ESMIEU (F).
Première étude française de vaccination contre la rubéole
avec la souche atténuée Cendehill.
- 168 - LIEBHABER (H).
Measurement of rubella antibody by hemagglutination inhibition.
I. Variables affecting rubella hemagglutination.
J. Immunol. 1970. 104. 818-825.
- 169 - LIEBHABER (H)
Measurement of rubella antibody by hemagglutination inhibition II.
Characteristics of an improved HAI test employing a new
method for the removal of non-immunoglobulin H.A. inhibitors
from serum.
J. Immunol. 1970. 104. 826-834.
- 170 - LUNDSTROM (R)
Rubella during pregnancy
Acta. Paediat. 1962. 81. suppl. 133. 1-10.
- 171 - Mc CARTHY (K), TAYLOR-ROBINSON (C.H), PELLINGER (S.E)
Isolation of rubella virus from cases in Britain.
Lancet 1963. 2. 593-598.

- 172 - Mc CARTHY (K), TAYLOR-ROBINSON (C.H)
Rubella.
Brit. Med. Bull. 1967. 23. 185-191.
- 173 - Mc DONALD (J.C), and PECKHAM (C.S)
Gammaglobulin in prévention of rubella and congenital defect.
Brit. Med. J. 1967. 633-637.
- 174 - MANN (J.J), ROSSEN (R.D), LEHRICH (J.R) and KASEL (J.A)
The effect of kaolin on immunoglobulins : an improved
technique to remove the non specific serum inhibitor of reovirus
hemagglutination.
J. Immunol. 1967. 981. 1136-1142.
- 175 - MARC (Y)
Quelques données d'actualité sur la rubéole.
Bordeaux. Med. 1969. 2. 4. 833-835.
- 176 - MARECHAL (M.F)
Prophylaxie des embryopathies rubéoliques.
Thèse, Grenoble 1970.
- 177 - MARIEL (C)
Epidémiologie de la rougeole et de la rubéole.
Revue du Prat. 1971. 21. 5. 757. 762.
- 178 - MAURIN (J)
La rubéole : sur quelques travaux recents.
G.M.F. 1968. 75. 7. 1411-1418.
- 179 - MAURIN (J.)
Epidémiologie et dépistage de la rubéole.
Le Pharm. Biol. 1969. 6, 63. 301-304.
- 180 - MAURIN (J)
Le virus de la rubéole
Bull. Inst. Pasteur. 1969. 67. 483.
- 181 - MENSER (M) and al.
Renal lésions in congenital rubella.
Pediatrics. 1967. 40. 901-904.
- 182 - MENSER (M) and al.
Congenital malformations after maternal rubella.
Brit. Med. J. 1968. 4. 534.

- 183 - MERIEUX (B.D)
Diagnostic sérologique de la rubéole. Réaction d'inhibition de l'hémagglutination.
Fiche technique.
- 184 - MEYER (H.M), PARKMAN (P.D), et DANOS (T.C)
Attenuated rubella virus II. Production of an experimental live-virus vaccine and clinical trial.
New-Engl. J. Med. 1966. Vol. 275. 575-580.
- 185 - MEYER (H.M), PARKMAN (P.D), HOBBS (T.E), LARSON (H.E), DAVIS (W.J), SIMSARIAN (J.P) and HOPPS (H.E)
Attenuated rubella viruses. Laboratory and clinical characteristics.
Amer. J. Dis. Child. 1969. 118. 155-165.
- 186 - MEYER (H.M), PARKMAN (P.D), HOBBS (T.E) and ENNIS (F.A)
Clinical studies with experimental live rubella virus vaccine (strain HPV 77) evaluation of vaccine induced immunity.
Amer. J. Dis. Child. 1968. 115. 648-654.
- 187 - MICHAELS (R.H)
Immunologic aspects of congenital rubella.
Pediatrics 1969. 43. 339.
- 187 bis MICHAELS (R.H) and MELLIN (G.W)
Prospective experience with maternal rubella and the associated congenital malformations.
Pediatrics 1960. 26. 200-209.
- 188 - MILLIAN (S.J), WEGMAN (P.D)
Rubella serology : applications, limitations and interpretations.
Amer. J. Publ. Hlth. 1972. 62,2. 171-176.
- 189 - MONIF (G.R.G), AVERY (G.B), KORONES (S.B) and SEVER (J.L)
Post mortem isolation of rubella virus from three children with rubella syndrom defects.
Lancet 1965. I. 723-724.
- 190 - MONNET (P)
Faits récents concernant la rubéole congénitale.
Rev. Med. Lyon 1968. 17. 371-378.
- 191 - MONNET (P), NICOLAS (A), LANG (R)
Vaccinations antirubéoleuse avec la souche Plottkin.
Presse Med. 1970. 78. 107.

- 192 - MONNET (P), NICOLAS (A), LANG (R)
Vaccination antirubéoleuse avec la souche PLOTKIN.
Lyon Medical 1970. 223. 165.
- 193 - MONNET (P)
Rubéole congénitale
Revue du Prat. 1971. 21, 5. 715-39.
- 194 - MURPHEY (A.M) and REID (R.R)
A comparaison of neutraizing antibodies to rubella virus
in gammaglobulin and convalescent sera.
Med. J. Austr. 1967. 1. 369.
- 195 - NAEYE (R.L) and BLANC (W)
Pathogenesis of congenital rubella.
J. Amer. Med. Assoc. 1965. 194. 1277-1283.
- 196 - NICOLAS (A)
Méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic de la
rubéole. La technique d'inhibition de l'hémagglutination.
Lyon Med. 1967. 218. 27. 19-54.
- 197 - NICOLAS (J.C), HURAUX (J.M), BRICOUT (F)
La sérologie de la rubéole chez la femme enceinte.
Interprétation des résultats.
C.M. 1974 96, 19. 3011-3029.
- 198 - NORRBY (E), MAGNUSSON (P), FRIDING (B), and GARD (S)
A note on the morphology of rubella virus.
Arch. Ges. virusforsch. 1963. 13. 421-424.
- 198 bis NORRBY (E)
Hemagglutination by measles virus : a simple procedure for
production of high potency antigen for hemagglutination
inhibition test.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962. III 814-818.
- 199 - NOTTER (A)
Immunologic study from german measles, poliomyelites, and
measles in the mother's blood (veins, retroplacenta, placenta)
in the milk and the newborn's blood.
6ème Congrès mondial Fed. Int. Gyn. Obst. (N.Y) 1970.
- 200 - NUSBACHER (J), HIRSHBORN (K) and COOPER (L.Z)
Chromosomal abnormalities in congenital rubella.
New. England J. Med. 1967. 276. 1409-1413.

- 201 - PAPIERNIK-BERKAUER (E), BOUE (A) et LEVY (S)
Sérologie systématique de la rubéole et vaccination dans le
post-partum.
Gyn. Obst. 1968. 3. 289-296.
- 202 - PAPAEOANGELOU (G.J.) and al.
Evaluation of the haemagglutination-inhibition test for the
serologic diagnosis of rubella.
Path. Microbiol. (Basel) 1968. 32. 267-276.
- 203 - PARKMANN (P.D), BUESCHER (E.L.) and HARTENSTEIN (M.S)
Recovery of rubella virus from army recruits.
Proc. Soc. exp. Biol. 1962. 111. 225-230.
- 204 - PARKMANN (P.D), BUESCHER (E.L), ARTENSTEIN (M.S), Mc COWN (J.M)
MUNDON (F.K) and DRUZD (A.D)
Studies of rubella I. Properties of the virus.
J. Immunol. 1964. 93. 595-607.
- 205 - PARKMANN (P.D), MUNDON (F.K), Mc COWN (J.M) and BUESCHER (E.L)
Studies of rubella virus II. The neutralization of the virus.
J. of Immunology 1964. 93, 4. 608-617.
- 206 - PARCKMANN (P.D), MEYER (H.M), KIRSCHSTEIN (R.L) and HOPPS (H.E)
Attenuated rubella virus I. Developpement and laboratory
characterization.
New-England J. Med. 1966. 275. 559-574.
- 207 - PEETERMANS (J.J) et HUYGELEN (C)
L'emploi d'hématies de pigeon dans le test d'inhibition
de l'hémagglutination de la rubéole.
Presse Med. 1967. 75. 2177-2178.
- 208 - PEETERMANS (J), HUYGELEN (C).
Attenuation of rubella virus by serial passages in primary
rabbit kidney cell cultures.
Arch. Ges. Virusforsch 1967 21, 133.
- 209 - PERLINO (C.A) and ISACSON (P)
Direct hemadsorption by cell cultures infected with
rubella virus.
Amer. J. Dis. Child. 1969. 118. 83-88.
- 210 - PEROL (Y) et CHRISTOL (D)
Pratique de la sérologie de la rubéole par inhibition de
l'hémagglutination en milieu hospitalier.
Sem. Hôp. Paris 1968. 44. 2160-2168.

- 211 - PHILLIPS (P.E), PARKMANN (P.D), KIRSCHSTEIN (R.L.) and MEYER (H.M)
Experimental rubella virus infection in the Rhesus monkey.
Fed. Proc. Abst. 1965. 24. 570.
- 212 - PHILLIPS (C.A), BEHBEHANI (A.M), JOHNSON (L.W) and MELNICK (J.L)
Isolation of rubella virus. An epidemic characterized by rash and arthritis.
J. Amer. Med. Assoc. 1965. 191. 615-618.
- 213 - PHILLIPS (C.A), MELNICK (J.L), YOW (M.D), BAYATPOUR (M), and BURCKHARDT (M).
Persistence of virus in infants with congenital rubella and in normal infants with a history of maternal rubella.
J. Amer. Med.Ass. 1965. 193. 1027-1029.
- 215 - PIZON (R)
Les lésions osseuses de l'embryopathie rubéolique
Presse Med. 1967. 75. 46.
- 216 - PLOTKIN (S.A), DUDGEON (J.A), RAMSAY (A.M)
Laboratory studies in rubella and the rubella syndrome.
Brit. Med. J. 1963. 2. 1296-1299.
- 217 - PLOTKIN (S.A)
Virologic assistance in the management of German Measles in pregnancy.
J.A.M.A. 1964. 190. 265.
- 218 - PLOTKIN (S.A), DUDGEON (J.A), INGALLS (T.H)
Studies of the immunization with living rubella virus
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110, 4. 381-389.
- 219 - PLOTKIN (S.A) and al.
Some recently recognized manifestations of the rubella syndrome.
J. Pediat. 1965 (aug) 67. 182-191.
- 220 - PLOTKIN (S.A) and al.
Congenital rubella syndrom in late infancy.
J.A.M.A. 1967. 200. 435-441.
- 221 - PLOTKIN (S.A) and al.
A simple method for removal of rubella haemagglutination inhibition from serum adaptable to finger tip-blood.
Amer. J. Epidem. 1968. 88. 301-304.

- 222 - PLOTKIN (S.A), and MELIMAN (W.J)
Rubella in the distant past a possible cause of congenital malformations.
Amer. J. Obst. Gyn. 1970. 108, 3. 487-489.
- 223 - PLOTKIN (S.A)
Plaquing of rubella virus in RK 13 cells.
Arch. Ges. Virus forchung 16. 1, 5. 423-425.
- 224 - QUIRIN (E.P), NELSON (D.B) and INHORN (S.L)
Use of Trypsin-Modified Human Erythrocytes in rubella Hemagglutination inhibition testing.
Applied. Microbiol. Sept. 1972. 353- 357.
- 225 - RADU (J.M)
Intérêt de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination dans le diagnostic et l'épidémiologie de la rubéole.
Thèse Lille, 1970.
- 226 - RAUSEN (A.R) and al.
Hematologic effects of intra uterine rubella.
J.A.M.A. 1967. 199. 75.
- 227 - DE RAUTLIN DE LA ROY (Y)
A propos du diagnostic sérologique de la rubéole et de son interprétation.
C.M. 1973. 95, 21. 3901-3907.
- 228 - RAVINA (A) et RAVINAT (J.H)
Les malformations d'origine virale et leur prophylaxie.
Presse Med. 1970. 78. 123-125.
- 229 - RAWLS (W.E), and MELNICK (J.L), ROSENBERG (H.S) BAYATPOUR (M).
Spontaneous virus carrier cultures and post mortem isolation of virus from infants with congenital rubella.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1965. 120. 623-626.
- 230 - RAWLS (W.E) and MELNICK (J.L)
Rubella virus carrier cultures derived from congenital infected infants.
J. Exp. Med. 1966. 123. 795-816.
- 231 - RAWLS (W.E) and al.
Serologic diagnosis and foetal involvement in maternal rubella. Criteria for abortion.
J.A.M.A. 1968. 203. 627-631

- 232 - Recherche et Industrie Thérapeutiques.
Le test rubéole.
Documentation 1967.
- 233 - Recherche et Industrie Thérapeutiques.
Pourquoi, quand, comment demander un test rubéole ?
Documentation 1969.
- 234 - REYNAUD (M.P), SIROT (J), MICHEL (J), TOURNAIRE (E),
CLUZEL (R)
Données immunologiques sur la rubéole dans la région de
Clermont-Ferrand.
Lyon-Méditerranée 1970.
- 235 - REYNOLDS (D.W) and al.
Hearing loss after maternal rubella need for accurate
diagnosis of maternal infection.
Pediatrics 1970. 46. 159-160.
- 236 - RORKE (L.E) and SPIRO (A.J)
Cerebral lesions on congenital rubella syndrom.
J. of Pediatr. 1967. 70. 243.
- 237 - ROSSIER (E)
Valeur du Test de l'inhibition de l'hémagglutination dans
le diagnostic de la rubéole de la femme enceinte.
Presse Med. 1968. 76. 1516.
- 238 - ROUQUES (L)
Indications et interprétations du serodiagnostic de
la rubéole.
Presse Med. 1969. 77. n°11. 401.
- 239 - ROUQUETTE (C), GUYOT (M.M), BODOUTCHIAN (A), GARNIER (F),
BRICET (A).
Données concernant la rubéole au cours de la grossesse.
Revue du Prat. 1969. 19. 67-75.
- 240 - Laboratoire ROUSSEL.
La rubéole.
24- Les arbitres du diagnostic.
- 241 - ROUVILLOIS (J.L)
Rubéole et grossesse.
Vie Med. 1970. 30. 4091-4092.

- 242 - RUDIVAX
Vaccin contre la rubéole.
Documentation (Institut Mérieux) 1970.
- 243 - RUDOLPH (A.S), SINGLETON (A.B), ROSENBERG (H.S), SINGER (D.B),
PHILLIPS (C.A).
Osseous manifestations of the congenital rubella syndrom.
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110. 428-433.
- 244 - RUDOLPH (A.J), YOW (M.D), PHILLIPS (C.A), DESMOND (M.M),
BLATTNER (R.J), MELNICK (J.L).
Transplacental rubella infection in newly born infants.
J. Amer. Med. Ass. 1965. 191. 843-845.
- 245 - SAINT-JACQUES (J), ROUSTAN (R), COHEN-SOLAL (J), LANEGUES (M),
HERRAULT (A).
Que faut-il savoir de la rubéole ?
Immex 1970. 10. 1290-1305.
- 246 - DE SAINT-MAUR (G) et BRICOUT (F)
Formes atypiques de la rougeole et de la rubéole.
Presse Med. 1969. 77. 25. 911-913.
- 247 - SALLOMI (S.J)
Rubella in pregnancy. A review of prospectives studies
from the literature.
Obs. Gyn. 1966. 27. 252.
- 248 - SAMAILLE (J) et TONNEL (A)
Le sérodiagnostic de la rubéole par la réaction d'inhibition
de l'hémagglutination.
Lille, Med. 1968.
- 249 - SCHIFF (G.M), SEVER (J.L) and HUEBNER (R.J)
Rubella virus : Neutralizing antibody in commercial
gammaglobulin.
Sciences. 1963. 142. 58-60.
- 250 - SCHIFF (G.M), SEVER (J.L) et HUEBNER (R.J)
Clinical and laboratory findings in experimental rubella.
Arch. Intern. Med. 1965. 116. 537-543.
- 251 - SCHIMKE and al.
Immunologic deficiency in the congenital rubella syndrom.
Amer. J. Dis. Child. 1969. 118. 626.

- 252 - SCHIFF (G.M), SMITH (H.D), DIGNAN (P) et SEVER (J.L)
Rubella : studies in the natural disease. The significance
of antibody status and communicability among young women.
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110. 366-369.
- 253 - SCHIFF (G.M), DINE (M.S)
Transmission of rubella from newborns ?
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110. 447.
- 254 - SCHIFF (G.M), SUTHERLAND (J.M), LIGHT (L.J), BLOOM (J.L)
Studies on congenital rubella : preliminary results on
the frequency and significance of presence of rubella
virus in the newborn.
Amer. J. Dis. Child. 1965. 140. 441-443.
- 255 - SCHIFF (G.M) et SEVER (J.L)
Rubella recent laboratory and clinical advances.
Prog. Med. Virol. 1966. 8. 30-61.
- 256 - SCHMIDT (N.J), LENETTE (E.H), WOODIE (J.D), et HO (H.H)
Identification of rubella virus isolates by immunofluorescent
staining and a comparison of the sensitivity of three cell
culture systems for recovery of virus.
J. Lab. Clin. Med. 1966. 68, 3. 502-509.
- 257 - SCHMIDT (N.J)
The complément fixing antigen of rubella virus
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966. 121, 1. 243-250.
- 258 - SCHMIDT (N.J), DENNIS (J) and LENNETTE (E.U)
Hemadsorption and hemadsorption inhibition tests for
rubella virus.
Arch. Virusforsch. 1968. 25. 308-320.
- 259 - SCHMIDT (N.J) and LENNETTE (E.H)
Complément fixing and fluorescent antibody responses to
an attenuated rubella virus vaccine.
Amer. J. Epidem. 1970. 91. 351-354.
- 260 - SCHMIDT (N.J), LENETTE (E.H)
Variables of the rubella hemagglutination-inhibition test
system and their effect on antigen and antibody titers.
Appl. Microb. 1970. 19. 491-504.

- 261 - SCHMIDT (N.J), DENIS (J), LENETTE (E.H)
Rubella virus hemagglutination with a wide variety of erythrocyte species.
Appl. Microb. 1971. 22. 469-470.
- 262 - SCHMIDT (N.J) and DENNIS (J)
Modified hemagglutination-inhibition test for rubella, employing human group O erythrocytes.
Appl. Microbiol. 1972. 23. 471-475.
- 263 - SCHWARTZ (R.W)
Clinical considerations of rubella in pregnancy
N.Y.J. Med. 1968. 68. 392-397
- 264 - SERRES A. et BASCOUL (S)
L'inhibition de l'hémagglutination dans le sérodiagnostic de la rubéole. Cas de malformations congénitales.
G.M.F. 1969. 76. 23. 4313-4322.
- 265 - SEVER (J.L), SCHIFF (G.M), TRAUB (R.G)
Rubella virus.
J.A.M.A. 1962. 182. 663-671.
- 266 - SEVER (J.L), SCHIFF (G.M), HUEBNER (R.J)
Frequency of rubella antibody among pregnancy women and other human and animal population.
Obst. Gyn. 1964. 23. 153-159.
- 267 - SEVER (J.L), MONIF (G.RG)
Limited persistence of virus in congenital rubella.
Amer. J. Dis. Child. 1965. 110. 452.
- 268 - SEVER (J.L), BRODY (J.A), SCHIFF (G.M), Mc ALLISTER (R) et CUTTING (R).
Rubella epidemic in the Pribilofs II. Clinical and laboratory findings.
J. Amer. Med. Assoc. 1965. 191. 624-626.
- 269 - SEVER (J.L) and al.
Rubella complement fixation test.
Sciences 1965. 148. 385-387.
- 270 - SEVER (J.L) and al.
Rubella antibody determination.
Pediatrics 1967. 40. 789-797.
- 271 - SEVER (J.L)
Immunoglobulin determination for the detection of perinatal infections.
J. Pediatr. 1969. 75. 1111-1115.

- 272 - SEVER (J.L)
Evaluation du pronostic foetal chez la femme atteinte de rubéole pendant la grossesse. Abord. pratique.
Rev. Med. Franç. 1971. 12, 22. 1393-1400.
- 273 - SEROLOGIE DE LA RUBEOLE
Inhibition de l'héماغglutination.
Documentation de l'Institut Pasteur.
- 274 - SIEGEL (M), FUERST (H.T) et PERESS (N.S)
Comparative fatal mortality in maternal virus diseases.
A prospective study.
New-England J. Med. 1966. 374, 14. 768-771.
- 275 - SIEGEL (N)
Mortalité foetale et rubéole maternelle. Dermatoglyphes dans le syndrome rubéoleux.
N.Y.H.D. 1968.
- 276 - SIGURDARDOTTIR (B), GIVAN (K.F), ROZEE (K.R), RHODES (A.J)
Association of virus with cases of rubella studied in Toronto : Propagation of the agent and transmission to monkeys.
Canad. Med. Ass. J. 1963. 88. 128-132.
- 277 - SIMONS (M.J)
Congenital rubella : an immunological paradox.
Lancet 1968. 2. 1275.
- 278 - SINGER (D.B) and al.
Pathology of the congenital rubella syndrom.
J. of. Pediatrics 1967, 71, 665-675.
- 279 - SITTERLE-SOULA (M.T)
Vaccination contre la rubéole.
Thèse Toulouse 1970.
- 280 - SOHIER (R)
Chapitre sur la rubéole dans "Diagnostic des maladies à virus".
Edit. Med. Flammarion. 1964. 691-698.
- 281- SOHIER (R) et HENRY (M)
Enquête immunologique sur la rubéole. Recherche des anticorps neutralisants sur 201 sujets de sexe féminin.
Rev. Hyg. Med. Soc. 1967. 15, 3. 255-266.
- 282 - SOOTHILL (J.E), HAYES (K), DUDGEON (J.A)
The immunoglobulins in congenital rubella.
Lancet 1966. 1. 1385.

- 283 - STERN (H)
Rubella virus complement fixation test.
Nature. 1965. 208, 5006. 200-201.
- 284 - STEWART (G.L), PARKMANN (P.D), HOPPS (H.E), DOUGLAS (R.D),
HAMILTON (J.P), MEYER (H.M)
Rubella virus hemagglutination-inhibition test.
New-England J. Med. 1967. 276. 554-557.
- 285 - STRÄNNEGÅRD (O), HOLM (S.E), HERMODSSON (S), NORRBY (R),
LUCKE (E).
Case of apparent reinfection with rubella.
Lancet 1970. 1. 240-241.
- 286 - SWAN (C) and al.
Congenital defects in infants following infectious diseases
during pregnancy with special reference to relationship
between GM and cataract, deaf mutism, heart disease and
microcephaly and to period of pregnancy.
M. J. Aust. 1943. 2. 201.
- 287 - TAMALET (J) et al.
Immunité antirubéoleuse chez la femme enceinte - premiers
résultats de la région marseillaise.
Marseille Med. 1968. 9. 687-689
- 288 - TONNEL (A), DUBOIS (D), BLIN (C), WATTRE (P) SEMAILLE (J)
La réaction d'inhibition de l'hémagglutination et son
application au diagnostic de la rubéole.
Ann. Inst. Past. (Lille) 1967. 18. 142-152.
- 289 - TONNEL (A), SEMAILLE (J), DUBOIS (D)
Applications des notions récentes sur le virus de la
rubéole au diagnostic de l'infection chez la femme au cours
de la grossesse.
La femme et l'enfant. 1968. 11. 29.
- 290 - TRON (P.H)
Rubéole : acquisitions récentes.
G.M.F. 1966. 977-983.
- 291 - TRON (P.H)
La rubéole congénitale : étude clinique.
Arch. Franç. Ped. 1967. 24. 351.
- 292 - TRON (P.H)
Rubéole.
G.M.F. 1970. 5853-5856.

- 294 - VAHERI (A), SEDWICK (W.D), PLOTKIN (S.A), MAEB (R)
Cytopathic effect of rubella virus in BHK21 cells and growth to high titers in suspension culture.
Virology 1965. 27, 2. 239-241.
- 295 - VERGER (P), GUILLARD (J.M), SANDLER (B), JOIGNY (C), BENTEGEAT (J)
Fréquence du purpura thrombocytopénique aigu de l'enfant consécutif à la rubéole.
Ann. Pediat. 1970. 17, 1. 31-36.
- 296 - VERLIAC (F)
Prophylaxie de la rubéole.
Rev. du Prat. 1971. 21. 741-754.
- 297 - VERONELLI (J.A), MAASSAB (H.F) and HENNESSY (A.V)
Isolation in tissue culture of an interfering agent from patients with rubella.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962. 3. 462-476.
- 298 - VERONELLI (J.A) and ECKERT (E.A)
A new technique for preparation of rubella complement fixing antigen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966. 121, 4. 1223-1227.
- 299 - VESIKARI (T) and VAHERI (A)
Rubella : a method for rapid diagnosis of a recent infection by demonstration of the IgM antibodies.
Brit. Med. J. 1968. 1. 221-223.
- 300 - VESIKARI (T), VAHERI (A), LEINIKHI (P)
Antibody response to rubella vision (V) and soluble (S) antigen in rubella infection and following vaccination with live alternated rubella virus.
Arch. Virusforsch. 1971. 35. 25-27.
- 301 - VIRIEUX (Cl.)
Place de la sérologie de la rubéole au cours de la puerperalité. (à propos de 1488 titrages en série continue)
Thèse Lyon 1971.
- 302 - VIROLOGIE à l'usage des étudiants en médecine édité par A. MAMMETTE.
7ème éd. 1975. 173-181.
- 303 - WARKANY (J) et KALTER (H)
Congenital malformations.
New England J. Med. 1962. 265. 993.

- 304 - WELLER (T.H), NEVA (F.A)
Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella like illness.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962. 3. 215-225.
- 305 - WELLER (T.H), ALFORD (C.A) and NEVA (F.A)
Retrospective diagnosis by serologic means of congenitally acquired rubella infection.
New England J. 1964. 270. 1039-1041.
- 306 - WESSEL HOLF (C)
Medical progress : rubella (german measles)
New England J. Med. 1947. 236. 943-950, 978-988.
- 307 - ZINKHAM (W.H), MEDEARIS (D.N) and OSBORN (J.E)
Blood and bone marrow findings in congenital rubella.
J. of Pediat. 1967. 71. 1967.
- 308 - ZOURBAS (J) et ESMIEU (F)
La vaccination contre la rubéole des nourrissons et des filles en périodes pré et péripubère.
Med. Inf. 1969. 76. 591-597.
- 309 - ZOURBAS (J), MORIN (P), GRALL (F), BLACQUE-BELAIR (M).
La vaccination contre la rubéole à l'hôpital Lariboisière.
Sem. Hop. Paris. 1969. 45. 3235.
- 310 - ZOURBAS (J) et coll.
Vaccinations des jeunes femmes contre la rubéole principalement dans le post-partum.
Rev. Franç. Gyn. 1970. 65. 107-113.

TABLE DES MATIERES

PLAN	p. 1
INTRODUCTION	p. 7
CHAPITRE I - RAPPEL SUR LA RUBEOLE	p. 8
- Historique	p. 9
- Le virus de la rubéole	p. 10
- Epidémiologie	p. 12
- Clinique	p. 13
- Diagnostic biologique	p. 23
- Prophylaxie	p. 38
CHAPITRE II - LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION	p. 43
I - Principe de la réaction	p. 44
II - La technique de la réaction	p. 44
A- Les réactifs	p. 45
B- La préparation des sérums	p. 50
C- Technique utilisée à l'Institut Pasteur ..	p. 51
III - Les problèmes techniques de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination	p. 56
CHAPITRE III - ETUDE COMPARATIVE DE DEUX TECHNIQUES UTILISANT DES GLOBULES ROUGES HUMAINS O+ TRYPSINES AVEC UNE TECHNIQUE DE REFERENCE UTILISEE A L'INSTITUT PASTEUR	p. 62
I - Présentation des techniques	p. 63
II - Résultats	p. 72
III - Discussion	p. 87
CONCLUSION	p. 92
BIBLIOGRAPHIE	p. 95

